

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL**



# **CONTAMINANTES EM ALIMENTOS PARA CRIANÇAS - SIMULAÇÃO *IN VITRO* DO PROCESSO DIGESTIVO DE NITRATOS**

---

Zeila Cristina Neves Évora de Pina

**MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE**

**2011**

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL**



# **CONTAMINANTES EM ALIMENTOS PARA CRIANÇAS - SIMULAÇÃO IN VITRO DO PROCESSO DIGESTIVO DE NITRATOS**

Zeila Cristina Neves Évora de Pina

**MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE**

**DISSERTAÇÃO ORIENTADA POR:**

Doutora Elsa Reis Vasco

Prof. Doutora Deodália Dias

2011

**Este trabalho foi desenvolvido com em colaboração com a Doutora Paula Alvito, do Unidade de Investigação e Desenvolvimento, Departamento de Alimentação e Nutrição, INSA, Lisboa e CESAM, Universidade de Aveiro.**

## RESUMO

Uma alimentação adequada durante a infância é importante para o desenvolvimento adequado da criança. Os alimentos destinados a lactentes e crianças jovens devem ser monitorizados relativamente à presença de contaminantes, uma vez que as crianças constituem um grupo fisiologicamente vulnerável à acção de contaminantes nos alimentos. Os nitratos são iões que ocorrem naturalmente na natureza com alto potencial cumulativo em vegetais. A toxicidade dos nitratos resulta da sua conversão a nitritos, que podem levar à formação de metahemoglobinas, e de compostos cancerígenos N-nitrosos. Os estudos da bioacessibilidade determinam a fracção do contaminante presente numa matriz que será libertado após digestão e estará disponível para absorção. Até a data nenhum estudo foi realizado sobre a bioacessibilidade de nitratos sendo os dois objectivos principais a monitorização da ocorrência de nitratos em alimentação infantil incluindo o estudo da estabilidade a diferentes temperaturas e a avaliação da bioacessibilidade de nitratos nestes alimentos. A determinação do teor de nitratos nos alimentos preparados para lactentes e crianças jovens foi efectuada por um método de HPLC-UV. A determinação da bioacessibilidade foi efectuada implementando um modelo de digestão *in vitro* que simula as condições fisiológicas humanas na boca, estômago e intestino delgado. Por comparação dos teores de nitratos antes e depois da digestão obtém-se o valor da bioacessibilidade dos nitratos nestes alimentos.

Todas as amostras analisadas apresentaram teores de nitratos inferiores aos limites estabelecidos pelo Regulamento para alimentação infantil (200 mg NO<sub>3</sub>/kg), variando entre 24 mg NO<sub>3</sub>/kg e 164 mg NO<sub>3</sub>/kg, e valores de recuperação entre 71% e 163%. As amostras de origem convencional e biológica apresentaram um valor mediano de 55 mg/kg (máximo de 164 mg/kg) e um valor médio de 72 mg/kg (máximo de 139 mg/kg), respectivamente. Não foram registadas diferenças significativas entre os teores de nitratos obtidos para produtos de origem convencional e biológica.

Os estudos de estabilidade de nitratos revelaram uma diminuição geral de teores para amostras armazenadas a 4°C a partir da 2ª semana, com excepção de uma amostra, e durante o armazenamento -20°C, revelaram estabilidade até ao 2º meses de ensaio, com excepção de duas amostras.

Os resultados de bioacessibilidade de nitratos em alimentos infantis variaram entre 42% a 159%. Esta grande variabilidade foi atribuída a diferenças na composição da matriz que pode influenciar a bioacessibilidade.

**Palavras-chave:** Nitratos, bioacessibilidade, digestão *in vitro*, HPLC-UV,

## ABSTRACT

An adequate nutrition during childhood is important for proper development of the child. Foods for infants and young children should be monitored for the presence of contaminants, since children are physiologically more vulnerable group to the action of contaminants in food. Nitrates are naturally occurring ions with high cumulative potential in vegetables. The toxicity of nitrate results from its conversion to nitrite, which can lead to formation of methemoglobin, and carcinogenic N-nitroso compounds. Bioaccessibility determines the fraction of the contaminant present in a matrix that will be released after digestion and is available for absorption. To date no studies have been conducted on the bioaccessibility of nitrate being the two main objectives the monitoring of the occurrence of nitrate in infant foods including a study of the stability at different temperatures, and the evaluation of bioaccessibility of nitrate in these foods. The determination of nitrate in foods for infants and young children was carried out by an HPLC-UV method. The determination of bioaccessibilidade was implemented using an *in vitro* digestion model that simulates the human physiological conditions in the mouth, stomach and small intestine. Comparing the nitrate levels before and after digestion, the bioaccessibility of nitrates is calculated.

All samples showed nitrate levels below the limits set by the Regulation for infant foods (200 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg), ranging between 24 and 164 mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg, and recovery values between 71% and 163%. The samples of conventional and organic farming showed a median value of 55 mg/kg (maximum 164 mg/kg) and an average of 72 mg/kg (maximum 139 mg/kg), respectively. There were no significant differences between nitrate levels for products from conventional and organic. Stability studies of nitrates showed a decrease in concentrations for samples stored at 4°C from the second week, with the exception of one sample, and during the storage -20°C showed stability until the 2<sup>nd</sup> month test, except for two samples. The results of bioaccessibilidade nitrate in baby food ranged from 42% to 159%. This variability was attributed to differences in the composition of the matrix can influence the bioaccessibilidade.

**Keywords:** Nitrate, bioaccessibility, *in vitro* digestion, HPLC-UV

## AGRADECIMENTOS

Começo por agradecer às minhas orientadoras as Doutora Elsa Vasco e Professora Doutora Deodália Dias, à Doutora Paula Alvito pelo grande apoio, dedicação e imensa paciência no decorrer do planeamento e realização do trabalho laboratorial e elaboração desta tese de mestrado. Foi com muita disponibilidade e boa disposição que me acompanharam e ajudaram sempre em todos os passos o meu trabalho.

Agradeço à Dra. Maria Antónia Calhau, coordenadora do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN) do INSA, por ter permitido a realização deste trabalho no seu departamento.

Agradeço aos meus pais, Fátima e Zacarias, o enorme incentivo e preocupação, que desde o início me auxiliaram e apoiaram neste percurso para completar meus estudos, e que mesmo estando distantes tentaram sempre acreditar e deram-me forças de todas as formas possíveis.

Agradeço em especial à minha irmã, Kátia, o meu “porto seguro” em todas as horas e aos meus amigos, Rosy, Mónica, pelo apoio nos momentos bons e menos bons deste percurso, imprescindível para o sucesso deste trabalho.

Ao Nivaldo agradeço o amor, paciência e dedicação, estando sempre disponível para me “segurar” quando precisei.

Agradeço a todas as pessoas do DAN que de algum modo prestaram apoio laboratorial ou moral durante o meu percurso pelo departamento.

A todos os meus amigos em Cabo Verde que através de orações, ou simples palavras de incentivo e coragem, foram uma inspiração para continuar.

# ÍNDICE

<b>Resumo .....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>iii</b>
<b>Agradecimentos .....</b>	<b>iv</b>
<b>Índice .....</b>	<b>v</b>
<b>Índice de figuras .....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de tabelas .....</b>	<b>ix</b>
<b>Símbolos e abreviaturas .....</b>	<b>xi</b>
<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
1.1. Nitratos .....	1
1.1.1. Caracterização química.....	1
1.1.2. Ciclo do azoto .....	1
1.1.3. Agricultura biológica e convencional.....	3
1.1.4. Ocorrência em alimentos.....	6
1.1.5. Saúde humana.....	14
1.1.6. Avaliação de risco .....	18
1.1.7. Legislação.....	21
1.1.8. Metodologia analítica.....	23
1.2. Bioacessibilidade .....	26
1.2.1. Modelos .....	26
1.2.2. Processo Digestivo .....	33
1.2.3. Estudos de bioacessibilidade de contaminantes .....	34
<b>2. Objectivos.....</b>	<b>36</b>
<b>3. Parte experimental .....</b>	<b>37</b>
3.1. Amostras .....	37
3.2. Determinação quantitativa de nitratos .....	38
3.2.1. Fundamento do método .....	38



3.2.2.	<i>Reagentes e Soluções</i> .....	38
3.2.3.	<i>Materiais</i> .....	40
3.2.4.	<i>Equipamentos</i> .....	41
3.2.5.	<i>Procedimentos</i> .....	42
3.2.6.	<i>Cromatografia</i> .....	42
3.3.	<i>Estudos de repetibilidade e precisão intermédia</i> .....	45
3.4.	<i>Estudos de estabilidade</i> .....	46
3.5.	<i>Estudos de bioacessibilidade</i> .....	47
3.6.1.	<i>Fundamento do método</i> .....	47
3.5.2.	<i>Reagentes e Soluções</i> .....	47
3.5.3.	<i>Materiais</i> .....	50
3.5.4.	<i>Equipamentos</i> .....	50
3.5.5.	<i>Procedimentos</i> .....	51
<b>4.</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>57</b>
4.1.	<i>Determinação quantitativa de nitratos</i> .....	57
4.1.1.	<i>Estudos de repetibilidade e precisão intermédia</i> .....	59
4.1.3.	<i>Estudos de estabilidade</i> .....	65
4.2.	<i>Bioacessibilidade</i> .....	72
<b>5.</b>	<b>Conclusões e perspectivas futuras</b> .....	<b>82</b>
<b>6.</b>	<b>Bibliografia</b> .....	<b>84</b>
<b>7.</b>	<b>Anexos</b> .....	<b>91</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estrutura química do íão nitrato (PubChem, 2004) .....	1
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do ciclo do azoto (Pippens, 2011).....	3
<b>Figura 3.</b> Circulação entero-salivar de nitratos em humanos (Lundberg, Weitzberg, & Gladwin, 2008).....	15
<b>Figura 4.</b> representação esquemática de um aparelho de HPLC. ....	25
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática dos processos que determinam a biodisponibilidade (F) de um contaminante (adaptado de (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004)). ....	27
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática dos modelos de digestão <i>in vitro</i> : modelo de sucção, modelo de sucção-deglutição, modelo de deglutição em jejum e após ingestão de alimentos. ....	31
<b>Figura 7.</b> Representação esquemática das condições experimentais de um modelo de digestão <i>in vitro</i> simulando o processo digestivo após ingestão de alimentos (adaptado de (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004)). ....	32
<b>Figura 8.</b> Cromatograma de uma solução padrão de controlo de 6 µg/mL. ....	57
<b>Figura 9.</b> Cromatograma de uma solução amostra. ....	58
<b>Figura 10.</b> Variação do teor de nitratos ao longo do período de armazenamento a 4°C das amostras do grupo “só legumes”. ....	66
<b>Figura 11.</b> Variação do teor de nitratos ao longo do período de armazenamento a 4°C das amostras do grupo “carnes”. ....	67
<b>Figura 12.</b> Variação do teor de nitratos ao longo do período de armazenamento a 4°C das amostras do grupo “peixes”. ....	68
<b>Figura 13.</b> Variação do teor de nitratos ao longo do período de armazenamento a -20°C das amostras do grupo dos legumes. ....	69
<b>Figura 14.</b> Variação do teor de nitratos ao longo do período de armazenamento a -20°C das amostras do grupo das carnes. ....	70
<b>Figura 15.</b> Variação do teor de nitratos ao longo do período de armazenamento a -20°C das amostras do grupo das peixes. ....	71
<b>Figura 16.</b> Curvas de calibração relativos À digestão dos padrões de nitratos na ausência e na presença de alimento.....	75

<b>Figura 17.</b> Representação gráfica da bioacessibilidade (%) de nitratos em alimentação infantil (n=17) pelo modelo de digestão <i>in vitro</i> .....	78
<b>Figura 18.</b> Gráficos relativos aos valores de bioacessibilidade dos alimentos de acordo com o grupo “carne”, “peixe” ou “só legumes”.....	80

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação de vegetais de acordo com o seu teor em nitratos (em mg/kg de matéria fresca) (Santamaria, 2006). .....	7
<b>Tabela 2.</b> Comparação dos teores máximos de certos contaminantes entre os alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens e noutros alimentos para adultos de acordo com o Regulamento (CE) 1881/2006 (CE, 2006c) (adaptado de (Davin, Van Egroo, & Galesne, 2010a)). .....	10
<b>Tabela 3.</b> Concentrações de nitratos em alimentos infantis analisados em vários estudos (adaptado de (Tamme, Reinik, Roasto, Juhkam, Tenno, & Kiis, 2006)). .....	12
<b>Tabela 4.</b> Teores de nitratos recomendados para adição em alimentos processados ("Decreto-Lei N° 363/98, "). .....	13
<b>Tabela 5.</b> Estimativa da ingestão de nitratos de outras fontes além de aditivos alimentares a nível global (DDA baseada num peso corporal médio de 60 kg) (adaptada de (Santamaria, 2006)). .....	21
<b>Tabela 6.</b> Teores máximos de nitratos em alguns géneros alimentícios (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /kg de alimento) de acordo com o Regulamento (CE) N° 1881/2006 (CE, 2006c). .....	23
<b>Tabela 7.</b> Composição e pH dos sucos de digestão (Brandon, et al.). .....	52
<b>Tabela 8.</b> Resultados dos estudos de repetibilidade em 3 séries de análise (n=6 em cada série). .....	59
<b>Tabela 9.</b> Resultados dos estudos de precisão intermédia em 3 séries de análise (n=6 em cada série). .....	60
<b>Tabela 10.</b> Desvio padrão relativo da repetibilidade e da precisão intermédia obtidos experimentalmente e calculados (Regulamento (CE) 1882/2006) (CE, 2006d)... ..	61
<b>Tabela 11.</b> Ocorrência de nitratos em alimentos de origem convencional e respectiva percentagem de recuperação. ....	63
<b>Tabela 12.</b> Ocorrência de nitratos em alimentos de origem biológica e respectiva percentagem de recuperação. ....	64
<b>Tabela 13.</b> Grupos de amostras formados correspondentes aos alimentos preparados para latentes e crianças jovens. ....	66
<b>Tabela 14.</b> Resultados dos ensaios brancos dos estudos de bioacessibilidade (n=5). ...	73

<b>Tabela 15.</b> Estudo da solubilidade e estabilidade de padrões de nitratos na ausência de alimento (n=4, A-D), DP=desvio padrão, CV=coeficiente de variação .....	74
<b>Tabela 16.</b> Estudo da solubilidade e estabilidade de padrões de nitratos na presença de alimento (n=3, A-C), DP=desvio padrão, CV=coeficiente de variação .....	74
<b>Tabela 17.</b> Comparação dos teores de nitratos obtidos antes e após digestão <i>in vitro</i> e valores de bioacessibilidade (%) em alimentação infantil (n=17). .....	77

## SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AFB<sub>1</sub> – Aflatoxina B<sub>1</sub>

AFM<sub>1</sub> - Aflatoxina M<sub>1</sub>

AGROBIO – Associação Portuguesa de Agricultura Biológica

CE – Comissão Europeia

CONTAM – “Panel on Contaminants in the Food Chain”, Painel dos Contaminantes na Cadeia Alimentar

CV – Coeficiente de variação

DAN – Departamento de Alimentação e nutrição

DDA – Dose Diária Aceitável

DP – Desvio padrão

EC – electroforese capilar

EFSA – “European Food Safety Authority”, Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar

F – Biodisponibilidade

F<sub>A</sub> – absorção

F<sub>B</sub> – bioacessibilidade

Fe<sup>2+</sup> - Ião ferro

F<sub>H</sub> – metabolismo

GC – Cromatografia gasosa

HPLC – “High Performance Liquid Chromatography”, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC-UV – “High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector”, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector Ultravioleta

IARC – “International Agency for Research on Cancer”, Agencia Internacional de Investigação em Cancro

IC – cromatografia iónica

JECFA – “FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives of the United Nations”, Comissão conjunta de peritos em aditivos alimentares da FAO/WHO

LOD – “Limit of Detection”, Limite de Detecção

LOQ – “Limit of Quantification”, Limite de Quantificação

metHb – Metemoglobina

N<sub>2</sub> – Azoto

NH<sub>4</sub><sup>+</sup> - Amónia

NO – óxido nítrico

NO<sub>2</sub><sup>-</sup> - Nitrito

NO<sub>3</sub><sup>-</sup> - Nitrato

NOAEL – “No-Observed-Adverse-Effect-Level”, nível de efeitos adversos não observados

OMS – Organização Mundial de Saúde

OTA – Ocratoxina A

oxiHb – Oxihemoglobina

p.a. – Pró-análise

PET – Politereftalato de etileno

ppb – Partes por bilhão

ppm – Parte por milhão

r – Repetibilidade

SCF – “Scientific Committee for Food”, Comité Científico para Alimentação

t – Valor da variável de student

WHO – World Health Organization

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. NITRATOS

#### 1.1.1. CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

Os nitratos são iões que ocorrem naturalmente na natureza como parte do ciclo do azoto. A sua fórmula molecular é  $\text{NO}_3^-$  e é uma molécula estável formada por uma molécula de azoto e três moléculas de oxigénio (Figura 1), com uma massa molecular de 62.0049 g/mol. Os nitratos são geralmente encontrados na forma de sais orgânicos ou inorgânicos, como por exemplo o nitrato de sódio, e são muito solúveis em água (PubChem, 2004; WHO, 2011b).

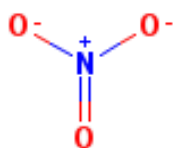


FIGURA 1. Estrutura química do ião nitrato (PubChem, 2004)

#### 1.1.2. CICLO DO AZOTO

O azoto ( $\text{N}_2$ ) constitui cerca de 78% da atmosfera terrestre. É um dos elementos químicos mais abundantes e um componente essencial para a vida, uma vez que representa um dos principais constituintes de todos os tecidos vivos, incorporado em diversas biomoléculas como proteínas e ácidos nucleicos (Gilchrist & Benjamin, 2011).

Na natureza, as moléculas de azoto existem principalmente no ar atmosférico, na água e no solo onde podem ser encontradas predominantemente sob as formas de nitratos ( $\text{NO}_3^-$ ) e nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ) (Geng, 2011). O azoto é altamente inerte, estando os dois



átomos ligados entre si por uma ligação tripla, a qual requer uma quantidade considerável de energia para se quebrar. Os organismos superiores não têm a capacidade para quebrar essa ligação. A conversão do azoto atmosférico inerte para o azoto biologicamente disponível é essencial para a vida e é conseguido por um processo denominado fixação. Este processo é realizado principalmente por acção microbiana, mas pode também ser realizado pela combustão de produtos fósseis, por processos industriais (processo de Haber-Bosch), e, em menor escala pela energia do relâmpago (Gilchrist & Benjamin, 2011).

Os processos que compõem do ciclo do azoto estão apresentados na Figura 2.

A fixação é o processo de conversão do azoto atmosférico a amoníaco ( $\text{NH}_3$ ), que por sua vez é convertido em amónia ( $\text{NH}_4^+$ ), e é efectuada principalmente por bactérias diazotróficas livres no solo ou simbióticas presentes nas raízes das plantas. O ião amónia pode existir também no solo por decomposição de compostos orgânicos, dos resíduos de animais ou vegetais mortos, por bactérias e fungos, através de um processo de amonificação ou por protonação do amoníaco (Gilchrist & Benjamin, 2011; Pippens, 2011). A amónia é oxidada a nitritos pela acção de bactérias nitrificantes chamadas nitrossomas, e estes são posteriormente oxidados a nitratos através da acção de nitrobactérias. Os nitratos são assimilados pelas plantas uma vez que são menos tóxicos do que os nitritos por isso são usados como principal forma de obtenção de azoto. A amónia pode também ser absorvida pelas plantas como fonte de azoto, mas a sua concentração no solo é geralmente baixa, uma vez que é facilmente convertida em nitratos (Geng, 2011). Nos casos de simbiose entre algumas bactérias, como, por exemplo, as bactérias *Rhizobium*, e as raízes de algumas plantas leguminosas, o azoto é transferido directamente para as células das plantas na forma de amoníaco e incorporado em aminas que são transportadas para toda a planta (Gilchrist & Benjamin, 2011).

O nitrato pode ser reconvertido no solo, em azoto inerte, que volta à atmosfera, através de bactérias desnitrificantes, no processo de desnitrificação (Pippens, 2011).

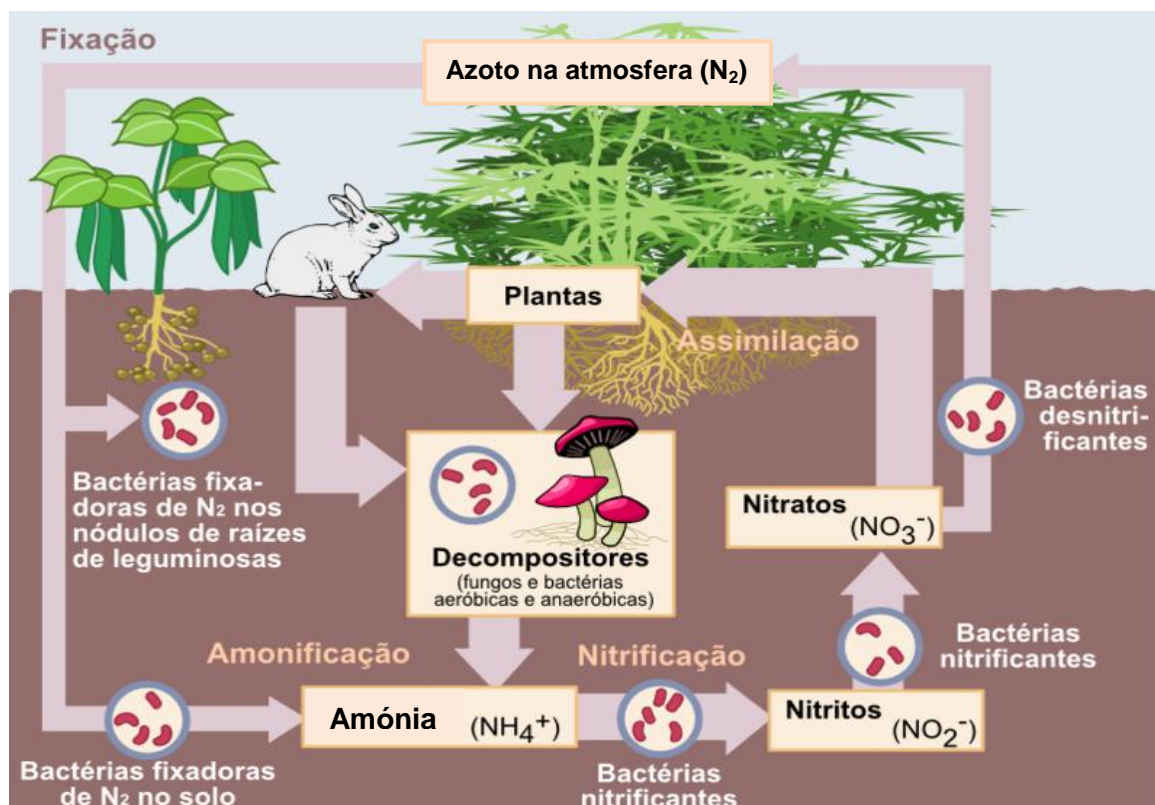


FIGURA 2. Representação esquemática do ciclo do azoto (PIPPENS, 2011).

### 1.1.3. AGRICULTURA BIOLÓGICA E CONVENCIONAL

A produção biológica é definida pelo Regulamento (CE) N° 834/2007, como “um sistema global de gestão das explorações agrícolas e de produção de géneros alimentícios que combina as melhores práticas ambientais, um elevado nível de biodiversidade, a preservação dos recursos naturais, a aplicação de normas exigentes em matéria de bem-estar dos animais e um método de produção em sintonia com a preferência de certos consumidores por produtos obtidos utilizando substâncias e processos naturais”. A produção biológica abrange a produção vegetal, animal e a aquicultura. A produção vegetal biológica mantém e/ou aumenta a fertilidade e a actividade biológica dos solos pela rotação plurianual das culturas, e pela aplicação de estrume ou de matérias orgânicas, de preferência compostados, provenientes da produção biológica (CE, 2007). Na agricultura convencional, por outro lado, podem ser utilizados fertilizantes químicos, pesticidas, fungicidas e outros químicos. O

Regulamento (CE) N° 834/2007 (CE, 2007) estabelece os objectivos, princípios e regras relativas à produção biológica e à rotulagem dos produtos biológicos.

Os alimentos produzidos no exterior, provenientes da agricultura biológica, podem, no entanto, estar expostos a contaminantes químicos do ambiente. Assim sendo, os produtos biológicos devem ser igualmente sujeitos a testes rigorosos aquando da sua inclusão na alimentação infantil (Davin, Van Egroo, & Galesne, 2010a).

Os nitratos acumulam-se nos solos devido à adição de fertilizantes ou quando a necessidade da cultura vegetal é menor que a taxa de produção de nitratos. A aplicação de fertilizantes azotados nos campos de cultura é muito utilizada em todo o mundo como uma forma barata e eficiente de aumentar a produção agrícola. Os fertilizantes azotados podem ser aplicados na forma de fertilizantes orgânicos como a ureia, ou fertilizantes inorgânicos como a amónia ou nitratos (Dwivedi, Mishra, Singh, & tripathi, 2007). A não utilização de fertilizantes minerais azotados pode levar a pensar que poderá haver uma menor acumulação de nitratos nos produtos vegetais, nos solos e nas águas subterrâneas, mas isso é provavelmente contrabalançado pela aplicação de estrumes animais que podem conter quantidades significativas de nitratos orgânicos (Di & Cameron, 2002).

A Agricultura Biológica tem crescido exponencialmente ao longo dos últimos anos, sendo praticada em mais de 120 países. Em Portugal foi criada em 1985 a Associação Portuguesa de Agricultura Biológica (AGROBIO) que protagoniza a divulgação da agricultura biológica em Portugal (AGROBIO, 2011; Cristóvão, Koehnen, & Strecht, 2001). Em 1999, a agricultura biológica representava cerca de 1% da área cultivada no país (Cristóvão, Koehnen, & Strecht, 2001) e em 2006 já representava 7,3% da área total cultivada, situado na 7ª posição da lista dos países com agricultura biológica por percentagem de área total cultivada (Willer, Yussefi-Menzler, & Sorensen, 2008). Estes valores mostram o rápido desenvolvimento e aumento significativo da agricultura biológica em Portugal nos últimos anos.

Vários estudos científicos têm sido efectuados sobre a comparação de produtos de origem biológica e convencional, relativamente às suas qualidades nutricionais e aos teores de contaminantes químicos. Malmauret e colaboradores (2002) efectuaram estudos de comparação do teor de metais pesados, nitratos, nitritos e micotoxinas em vários produtos vegetais e animais de origem biológica e convencional (Malmauret,

Parent-Massin, Hardy, & Verger, 2002). Neste estudo, verificaram teores mais elevados de chumbo, cádmio e nitratos em cenouras, espinafres e tomates de origem biológica, respectivamente. Lairon (2009) realizou um estudo de revisão bibliográfica em que verificou que a contaminação por micotoxinas era em geral menor nos produtos (cereais e derivados) de origem biológica mas com diferenças pouco significativas e, em alguns casos, comparáveis (alimentos infantis à base de cereais), em relação aos produtos de origem convencional (Lairon, 2009).

No estudo realizado por Hoogenboom e colaboradores (2008), os autores encontraram valores mais elevados em cenouras de origem biológica e em alfaces de origem convencional (Hoogenboom, Bokhorst, Northolt, Van De Vijver, Broex, Mevius, et al., 2008). Citak e Sonmez (2010) encontraram teores de nitratos mais baixos em espinafres cultivados com fertilização orgânica (Citak & Sonmez, 2010). No estudo realizado por De Martin e Restani (2003), estes autores verificaram diferenças entre os produtos vegetais cultivados na agricultura biológica e convencional, verificando que os vegetais de origem biológica continham teores de nitratos mais elevados do que os vegetais cultivados de modo convencional (De Martin & Restani, 2003).

Em Portugal têm sido efectuados estudos sobre contaminantes em alimentos obtidos pelos dois processos de produção. Alvito e colaboradores (2004) desenvolveram estudos sobre a ocorrência com metais pesados (chumbo, cádmio e mercúrio) e nitratos em 71 amostras de vegetais (alface, cenoura, couve lombarda e espinafres) de origem biológica e convencional, e verificaram não existirem diferenças significativas de metais pesados nos vegetais analisados. Em relação aos nitratos verificaram teores de nitratos mais elevados para vegetais de origem convencional. Duas amostras de espinafres (uma biológica e uma convencional) apresentavam valores superiores ao limite de 3000 mg/kg estabelecido pela EU (Alvito, Oliveira, Alcobia, Capucho, Fonseca, Vasconcelos, et al., 2004).

Barreira e colaboradores (2010) efectuaram um estudo sobre a ocorrência de patulina em alimentos à base de maçã em Portugal e encontraram teores deste contaminante mais elevados em alimentos à base de maçã de origem convencional do que os de origem biológica (Barreira, Alvito, & Almeida, 2010). Alvito e colaboradores (2010) efectuaram um estudo sobre a ocorrência de aflatoxinas (AFB<sub>1</sub> e AFM<sub>1</sub>) e ocratoxina A (OTA) em 27 amostras de alimentos infantis (leites em pó e farinhas à base de cereais), de origem biológica e convencional, disponíveis no mercado para consumo. Os

resultados revelaram a presença de 12 amostras com resultados positivos (superior ao limite de quantificação do método analítico) embora abaixo dos limites legislados, com teores compreendidos entre 0,017 e 0,041 µg/kg para AFM<sub>1</sub>; uma amostra com 0,009 µg/kg para AFB<sub>1</sub> e entre 0,034 e 0,212 µg/kg para OTA (Alvito, Sizoo, Almeida, & Van Egmond, 2010). Recentemente foi realizado um estudo por Vasco e Alvito (2011) (Vasco & Alvito, 2011) sobre a ocorrência de nitratos alimentos infantis em Portugal que revelou não existirem diferenças significativas no conteúdo de nitratos ao comparar alimentos infantis de origem convencional e biológica.

#### 1.1.4. OCORRÊNCIA EM ALIMENTOS

##### 1.1.4.1. Vegetais

Os nitratos são aniões que ocorrem naturalmente e podem ser encontrados praticamente em qualquer lugar no ambiente. A acumulação de nitrato nos vegetais depende de uma série de factores ambientais e agrícolas, entre eles a época de plantação e colheita, a luz, a humidade, a temperatura, as condições de cultivo, o uso de fertilizantes, a variedade das culturas e o armazenamento depois da colheita (EFSA, 2008). Os nitratos acumulam-se nos solos por causa da adição de fertilizantes ou quando a necessidade da cultura é muito menor do que a taxa de produção de nitratos. O parecer foi de levar em conta as

Na tabela 1 estão classificados alguns vegetais de acordo com o seu teor em nitratos (em mg/kg de matéria fresca), como tendo um teor muito baixo, baixo, médio, alto, ou muito alto em nitratos (Santamaria, 2006). No documento da Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA) de 2008 (EFSA, 2008), para avaliação dos riscos dos nitratos em vegetais, foram incluídos vários estudos de países Europeus sobre a quantidade de nitratos encontrados em vegetais e as considerações sobre os possíveis riscos e benefícios. As concentrações variaram muito entre os vegetais estudados, desde valores de 1 mg/kg (em ervilhas e couves de bruxelas) até valores de 4800 mg/kg (em rúcula). No geral as concentrações médias mais elevadas foram encontradas nos

vegetais folhosos, e os teores mais elevados foram encontrados para a rúcula com mais de metade dos valores submetidos superiores a 4500 mg/kg, enquanto níveis menores ocorrem em sementes ou tubérculos, por exemplo, em batatas e cenouras (EFSA, 2008). Os teores de nitratos encontrados foram diferentes nas várias partes da planta, podendo ser organizados de forma decrescente do teor de nitratos da seguinte forma: pecíolo > folha > caule > raiz > flor > tubérculo > bolbo > frutos > sementes (Santamaria, 2006).

**TABELA 1.** Classificação de vegetais de acordo com o seu teor em nitratos (em mg/kg de matéria fresca) (Santamaria, 2006).

Muito baixo (< 200)	Baixo (200-500)	Médio (500-1000)	Alto (1000-2500)	Muito alto (> 2500)
Alcachofra	Brócolos	Repolho	Aipo-Rábano	Aipo
Espargos	Cenoura	Grelo	Repolho chinês	Cerefólio
Feijão fava	Couve-flor	Endro	Endívia	Agrião
Beringela	Pepino	Radichio	Escarola	Alface
Couve-de-bruxelas	Abóbora	Couve-lombarda	Funcho	Rabanete
Alho		Nabo	Couve-rábano	Beterraba
Cebola			Chicória (folhas)	Rúcula
Feijão-verde			Alho-porro	Espinafre
Melão			Salsa	Acelga
Cogumelo				
Ervilha				
Pimento				
Batata				
Abobrinha				
Batata-doce				
Tomate				
Melancia				

Chung e colaboradores (2004) (Chung, Chou, & Hwang, 2004) estudaram a variação do teor de nitratos em alguns vegetais (entre eles espinafre, espinafre chinês, couve

chinesa), adquiridos em Taiwan, durante o armazenamento à temperatura ambiente (22 °C) e a 5 °C durante 7 dias. Estes autores observaram que durante o armazenamento a 5 °C, os teores de nitratos nos produtos hortícolas não foram afectados e mantiveram os valores de nitratos elevados e de nitritos baixos, evidenciando que os níveis de nitratos e nitritos foram pouco afectados (os nitratos não foram reduzidos a nitritos) durante o armazenamento refrigerado. Isto confirma que a actividade da enzima de redução do nitrato tende a ficar inactivada sob a condição de stress de armazenamento a frio. Por outro lado, os teores de nitratos e nitritos variaram significativamente durante o armazenamento à temperatura ambiente durante os 7 dias, tendo os níveis de nitratos diminuído significativamente à temperatura ambiente, enquanto os níveis de nitrito aumentaram drasticamente a partir do quarto dia de armazenamento. Os resultados revelaram que a temperatura de armazenamento pode ter um efeito significativo na alteração dos teores de nitrato e nitrito nos vegetais. Num estudo similar realizado por Tamme e colaboradores (2010) (Tamme, Reinik, Pussa, Roasto, Meremae, & Kiis, 2010) na Estónia em sumos de vegetais crus (cenouras, beterrabas, couves, rabanetes e abóboras), os autores verificaram que os valores de nitratos diminuíram significativamente durante o armazenamento à temperatura ambiente e os valores de nitritos aumentaram, e que houve pouca variação durante o armazenamento a 4-6°C. Destes estudos conclui-se que o armazenamento a frio pode ser uma forma adequada para evitar a acumulação de nitritos em vegetais, preservando a estabilidade dos nitratos. Chan (2011) concluiu, num estudo de revisão sobre o consumo de nitratos em vegetais, que o consumo de vegetais com teores mais elevados de nitratos pode ser seguro se preparado e armazenado correctamente (Chan, 2011).

#### 1.1.4.2. Alimentação infantil

A partir de cerca dos 6 meses de idade do bebé, o leite materno já não satisfaz as necessidades nutricionais e energéticas da criança, e esta deve ser iniciada em alimentos complementares, além da amamentação. À criança devem ser introduzidos alimentos complementares variados que devem incluir quantidades adequadas de carne, aves,

peixe ou ovos, frutas, vegetais e legumes todos os dias, de modo a assegurar que as necessidades nutricionais da criança sejam satisfeitas (Dewey, 2003; WHO, 2001).

Os alimentos infantis produzidos industrialmente e comercializados constituem uma parte importante de uma alimentação diversificada para lactentes e crianças jovens. Existe uma grande variedade de produtos alimentares infantis comercializados. A composição essencial desses alimentos deve ser adequada às necessidades nutricionais de lactentes e crianças jovens saudáveis, estabelecidos por dados científicos. Para os países Europeus a sua composição é regulada por duas Directivas específicas, “relativa às fórmulas para lactentes e fórmulas de transição” (CE, 2006b) e “relativa aos alimentos à base de cereais e aos alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens” (CE, 2006a). Os alimentos destinados a lactentes e crianças jovens devem ser preparados e administrados de maneira segura, de modo a minimizar o risco de contaminação. Os lactentes e crianças apresentam uma maior vulnerabilidade fisiológica aos efeitos da ingestão de contaminantes químicos nocivos em relação aos adultos por várias razões: as crianças consomem mais alimentos por unidade de peso corporal do que os adultos, os sistemas imunitário, nervoso, respiratório, reprodutor e digestivo das crianças estão ainda em desenvolvimento, e a exposição a químicos tóxicos podem provocar danos irreversíveis; e as crianças têm em geral um padrão de exposição a contaminantes no ambiente diferente dos adultos, uma vez que entram em contacto com contaminantes do ambiente mais facilmente por terem constantemente as mãos em contacto com objectos sujos ou no chão, e levarem os objectos e as mãos à boca (Dewey, 2003; WHO).

Os produtos destinados a lactentes (crianças com menos de 12 meses de idade) e crianças jovens (crianças com idade compreendida entre 1 e 3 anos) e estão sujeitos ao cumprimento rigoroso de critérios de controlo microbiológicos e químico, de modo a assegurar níveis máximos tão baixos quanto possível através de uma selecção rigorosa das matérias-primas, tanto de origem vegetal como animal, utilizadas na fabricação destes alimentos. As técnicas agrícolas utilizadas na produção de matérias-primas utilizadas na produção de alimentos infantis devem também ser controladas de modo que a presença de resíduos químicos seja reduzido a níveis tão baixos quanto possível, e que sejam respeitados os valores legislados, quando existentes, para os teores de certos contaminantes químicos na alimentação infantil, conforme se ilustra na Tabela 2 (Davin, Van Egroo, & Galesne, 2010a). Nesta tabela apresenta-se uma comparação



entre teores máximos de alguns contaminantes químicos em alimentos para crianças e adultos e a razão entre estes teores revelando os valores mais elevados para os últimos. De entre os vários contaminantes apresentados salientam-se os nitratos que serão objecto de estudo nesta tese.

**TABELA 2.** Comparação dos teores máximos de certos contaminantes entre os alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens e noutros alimentos para adultos de acordo com o Regulamento (CE) 1881/2006 (CE, 2006c) (adaptado de (DAVIN, VAN EGROO, & GALESNE, 2010A)).

Contaminante	Alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens	Alimentos para adultos – n° de vezes superior
Nitratos	200 ppm	10 a 22,5
Patulina	10 ppb	1 a 5
Aflatoxina B <sub>1</sub>	0.1 ppb	20 a 80
Ocratoxina A	0.5 ppb	4 a 20
Desoxinivalenol	200 ppb	2,5 a 8,75
Zearalenona	20 ppb	2,5 a 10
Fumonisinias	200 ppb	2 a 10
Estanho	50 ppm	2 a 4
Benzo(a)pireno	1 ppb	2 a 10

Os alimentos destinados crianças que incluem na sua composição vegetais ou legumes apresentam geralmente maiores concentrações de nitratos. Hardisson e colaboradores (1996) efectuaram um estudo em Espanha para avaliar os teores de nitratos e nitritos em alimentos destinados ao consumo de crianças em três marcas comerciais, e verificaram que os valores obtidos variavam significativamente de acordo com a composição dos alimentos infantis, e os alimentos cujas concentrações excediam os 250 mg/kg tinham

como ingrediente principal a cenoura (Hardisson, Padron, Frías, & Reguera, 1996). Tamme e colaboradores (2006) efectuaram um estudo na Estónia para analisar o conteúdo de nitratos e nitritos em vegetais e produtos infantis à base de vegetais e detectaram teores de nitratos mais elevados para alimentos infantis contendo cenoura e abóbora (62-148 e 124-162 mg/kg) e uma concentração média de 88 mg/kg em alimentos infantis (Tamme, Reinik, Roasto, Juhkam, Tenno, & Kiis, 2006). Pardo-Marín e colaboradores (2010) efectuaram um estudo sobre a monitorização do conteúdo de nitratos em vegetais e alimentos infantis à base de vegetais, e encontraram todos os valores abaixo do teor máximo estabelecido, com uma concentração média de nitratos nos alimentos infantis de aproximadamente 60 mg/kg (Pardo-Marin, Yusa-Pelecha, Villalba-Martin, & Perez-Dasi, 2010). No estudo efectuado por Vasco e Alvito (2011) registaram o valor de nitratos mais elevado na amostra contendo brócolos. Neste estudo todas as amostras analisadas apresentavam valores abaixo do teor legislado (200 mg/kg) com excepção de uma amostra que excedeu o teor máximo (230 mg/kg) (Vasco & Alvito, 2011). As concentrações mais baixas de nitratos nos estudos referidos foram encontradas em alimentos à base de purés e sumos de fruta (EFSA, 2008; Vasco & Alvito, 2011). Hardisson e colaboradores (1996) e Vasco e Alvito (2011) referiram que os produtos contendo bananas apresentavam uma maior concentração de nitratos do que outros produtos contendo outros tipos de fruta. Em todos os estudos referidos, os teores mais elevados de nitratos em alimentação infantil foi encontrado em alimentos contendo vegetais (Hardisson, Padron, Frías, & Reguera, 1996; Vasco & Alvito, 2011).

A tabela 3 apresenta um resumo de alguns estudos efectuados sobre os teores de nitratos em alimentação infantil em diferentes países.

**TABELA 3.** Concentrações de nitratos em alimentos infantis analisados em vários estudos (adaptado de (Tamme, Reinik, Roasto, Juhkam, Tenno, & Kiis, 2006)).

Tipo de alimento	Nitratos (mg/kg)			
	Espanha (Hardisson, et al., 1996)	Estónia (Tamme, et al., 2006)	Valência (Pardo- Marin et al., 2010)	Portugal (Vasco & Alvito, 2011)
À base de vegetais	-	19-208	60	102
Purés de carnes e vegetais	20-204	32-148	-	-
Purés de cereais e vegetais	382	24-162	-	-
Cenouras e sumos de cenouras	104	76-251	-	-
Purés/sumos de frutas	32-88	-	-	15/10

#### 1.1.4.3. Outras fontes de nitratos

A aplicação de fertilizantes azotados nos campos de cultura leva à acumulação de nitratos nos solos. Uma vez que as plantas não conseguem utilizar todo o azoto existente no solo, parte deste pode ser incorporado na matéria orgânica do solo, libertado para a atmosfera ou lixiviado para águas superficiais ou subterrâneas (Di & Cameron, 2002; Dwivedi, Mishra, Singh, & tripathi, 2007; Stuart, Gooddy, Bloomfield, & Williams, 2011). As águas subterrâneas são consideradas recursos importantes a serem protegidas uma vez que representam a fonte principal de água potável no mundo, devido à sua pureza relativa. Os nitratos são considerados como o segundo poluente mais comum das águas subterrâneas a seguir aos pesticidas, uma vez que os nitratos são solúveis e movem-se facilmente com a água do solo. A concentração de nitratos em águas superficiais e subterrâneas são geralmente baixas, com cerca de 0-18 mg/L em águas superficiais, mas podem atingir valores mais altos como resultado do escoamento de fertilizantes, ou contaminação com resíduos humanos e animais. Nas águas subterrâneas

os níveis de nitratos variam significativamente dependendo do tipo de solo, da localização geográfica e da actividade agrícola, podendo atingir centenas de miligramas por mililitros (WHO, 2011b). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estabeleceu um limite máximo para a concentração de nitrato em águas potáveis até aproximadamente 50 mg /L, baseado em estudos epidemiológicos da metahemoglobinemia (WHO, 2011a), (Di & Cameron, 2002; Powlson, Addiscott, Benjamin, Cassman, Kok, van Grinsven, et al., 2008).

Os nitratos são também utilizados como aditivos alimentares em carnes processadas, tais como salsichas, bacon, e outras carnes curadas, devido às suas capacidades de protecção e de inibição do crescimento de bactérias, nomeadamente *Clostridium botulinum*. Como aditivos têm também propriedades de fixação da cor dando a cor vermelho rosado característica das carnes, e contribuem também para o sabor e textura, devido à sua reacção com a mioglobina (Geng, 2011; Reinik, Tamme, & Roasto, 2007). A tabela 4 apresenta os teores de nitratos recomendados para adição em alimentos processados.

**TABELA 4.** Teores de nitratos recomendados para adição em alimentos processados ("Decreto-Lei N° 363/98,").

Designação	Géneros alimentícios	Quantidade adicionada	Quantidade residual	Limite máximo admissível
		(mg/kg)		
Nitrato de sódio	Produtos salgados e de salsicharia, incluindo os de sangue e outros enchidos	300	250	50-250
	Produtos à base de carne em conserva			
Nitrato de potássio	Queijo de pasta dura, semi-dura e semi-mole		50	50-250
	Sucedâneos de queijo à base de produtos lácteos			
	Conservas de arenque e espadilha em vinagre		200	50-250

### 1.1.5. SAÚDE HUMANA

A exposição humana aos nitratos é essencialmente exógena através do consumo de produtos hortícolas (mais de 80% dos nitratos ingeridos) e, em menor grau, de águas contaminadas e carnes curadas, embora possam também ser formados endogenamente. Em contraste, a exposição ao seu metabolito, nitrito, dá-se principalmente através da conversão endógena dos nitratos em nitritos. Os nitritos podem também ser consumidos como consequência do seu uso como conservante alimentar e, em menor medida, da sua presença nos produtos hortícolas (EFSA, 2008).

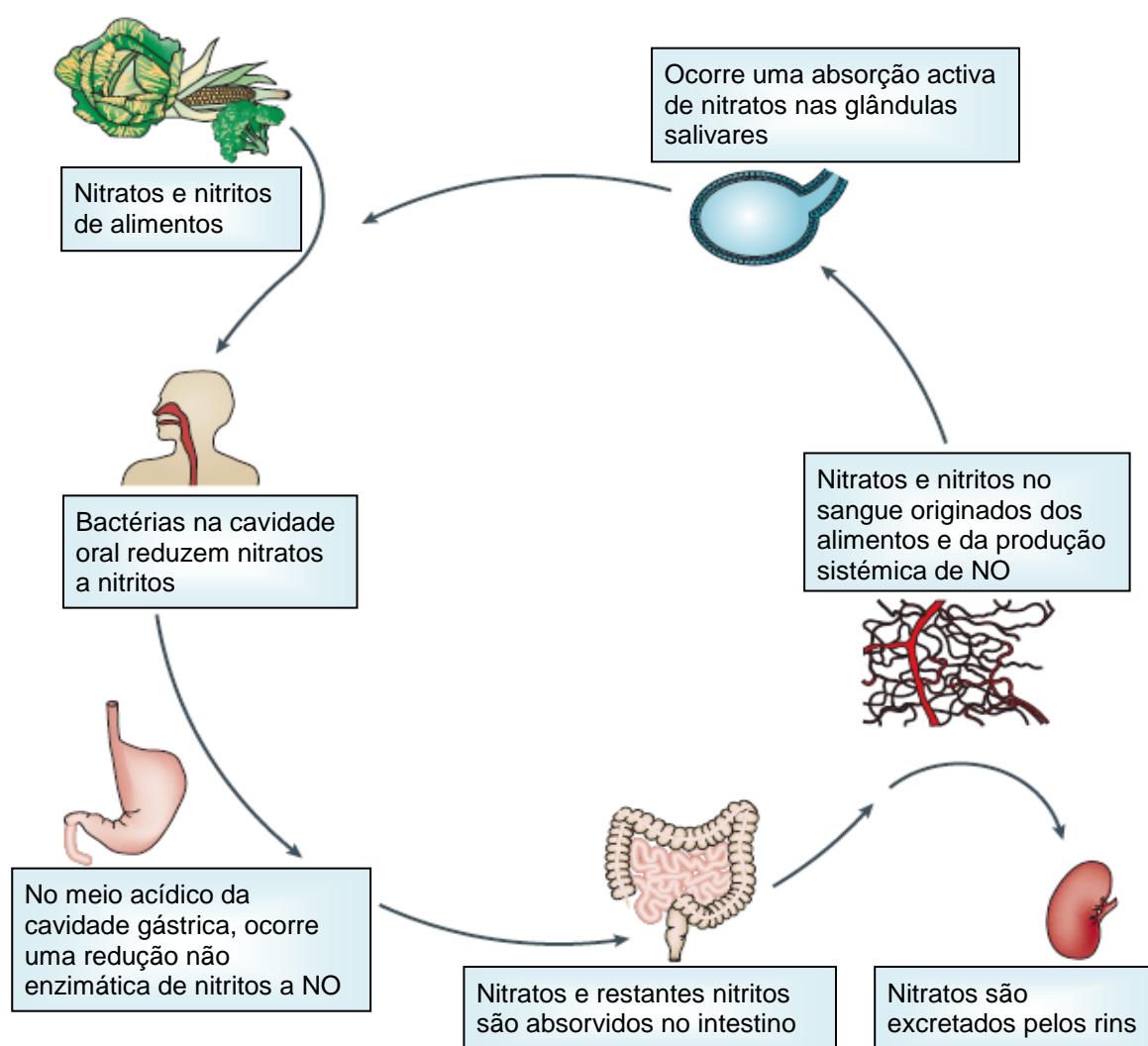
Os nitratos, por si só são relativamente não-tóxicos, mas a conversão *in vivo* de nitratos a nitritos aumenta significativamente o potencial tóxico dos nitratos. Os nitratos ingeridos que não são convertidos em nitritos são metabolizados e excretados sem produzir nenhum efeito adverso aparente (Santamaria, 2006).

O estudo metabolismo de nitratos é essencial para a avaliação e compreensão dos efeitos e riscos da ingestão deste contaminante para a saúde humana (McKnight, Duncan, Leifert, & Golden, 1999). Os nitratos sofrem uma série de interconversões metabólicas complexas, sendo reciclados entre a saliva e o intestino, através da recirculação entero-salivar dos nitratos (Figura 3) (EFSA, 2008).

A bioativação dos nitratos de fontes alimentares ou endógenas requer sua redução inicial a nitritos e essa conversão é realizada por bactérias comensais do trato gastrointestinal. Na cavidade bucal, as bactérias comensais facultativas anaeróbias reduzem cerca de 20% dos nitratos a nitritos pela acção de redutases de nitratos. Quando a saliva entra no estômago ácido, grande parte dos nitritos são rapidamente protonados para formar ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ) que se decompõe espontaneamente para formar óxido nítrico (NO), outros óxidos de azoto com funções fisiológicas e outros óxidos nitrogenados (EFSA, 2008; Lundberg, Weitzberg, & Gladwin, 2008).

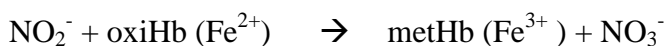
Os nitratos são rapidamente absorvidos na parte superior do intestino delgado para a circulação sanguínea, juntamente com os nitritos e o óxido nítrico. No sangue, misturam-se com os nitratos formados endogenamente. Depois de uma refeição rica em nitratos, os níveis no plasma sanguíneo aumentam significativamente e permanecerem elevados por um longo período de tempo. Os níveis de nitritos no plasma também aumentam após a ingestão de nitratos (EFSA, 2008). Embora grande parte dos nitratos

sejam eventualmente excretados na urina (cerca de 60%), 25 % dos nitratos do plasma são absorvidos pelas glândulas salivares e concentrados na saliva (EFSA, 2008; Gilchrist & Benjamin, 2011; Lundberg, Weitzberg, & Gladwin, 2008). A Figura 3 apresenta um esquema resumido da circulação entero-salivar descrita de nitratos em humanos. No sangue o óxido nítrico desempenha funções importantes, nomeadamente na transdução de sinal, na vasodilatação, regulação da pressão arterial, inibição de recrutamento de células endoteliais inflamatórias e agregação de plaquetas.



**FIGURA 3.** Circulação entero-salivar de nitratos em humanos (Lundberg, Weitzberg, & Gladwin, 2008).

O efeito mais conhecido dos nitritos nos humanos é a sua capacidade de reagir com a hemoglobina (oxiHb), oxidando o íon ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) para formar metahemoglobina (metHb) e nitrato:



**EQUAÇÃO 1.** Reacção dos nitritos com a hemoglobina oxidada (oxiHb) para originar a metahemoglobina (metHb).

A metahemoglobina é incapaz de ligar ao oxigénio, e como consequência, o transporte de oxigénio para os tecidos é dificultado, resultando em hipoxemia. Quando a proporção de metahemoglobina atinge os 10% dos níveis normais de hemoglobina (Hb), podem ser observados sintomas clínicos de cianose, coloração azul da pele devido à presença de sangue desoxigenado por asfixia. Esta condição potencialmente fatal é conhecida como metahemoglobinémia, ou “síndrome do bebé azul” (McKnight, Duncan, Leifert, & Golden, 1999; Santamaria, 2006). Os bebés são particularmente mais susceptíveis à metahemoglobinemia do que crianças e adultos por várias razões: têm um pH gástrico mais elevado o que faz com que o nitrito seja reduzido mais lentamente deixando mais para absorção; possuem baixas concentrações de agentes redutores; o consumo de nitratos através da água e dos alimentos é proporcionalmente mais elevado em relação ao peso corporal; a enzima redutase da metahemoglobina não está maduro ou há deficiências nesta enzima (McKnight, Duncan, Leifert, & Golden, 1999; Sanchez-Echaniz, Benito-Fernandez, & Mintegui-Raso, 2001; Santamaria, 2006). Crianças com concentrações de metahemoglobina inferiores a 20% podem ser tratadas simplesmente pela eliminação da fonte de exposição aos nitratos. Em casos severos, as crianças podem ser tratadas com administração intravenosa de solução de azul-de-metileno (Skipton & Hay, 1998). Geralmente, as crianças alimentadas com alimentos preparados comercialmente não apresentam grande risco de intoxicações. A amamentação não apresenta risco para as crianças (Greer & Shannon, 2005). Sanchez-Echaniz e colaboradores (2001) (Sanchez-Echaniz, Benito-Fernandez, & Mintegui-Raso, 2001) conduziram um estudo em Espanha comparando 7 casos de metahemoglobinémia em lactentes dos 7 aos 13 meses de idade, em que concluíram

que o consumo de acelgas e o armazenamento incorrecto de purés de vegetais são potenciais causadores da metahemoglobinémia infantil. Chan (2011) (Chan, 2011) recomenda que o consumo de alimentos infantis à base de vegetais preparados em casa seja evitado para crianças com menos de três meses de idade.

A segunda maior preocupação em relação à ingestão de nitratos é a possibilidade de esta poder estar associada à incidência de cancro gastrointestinal. A formação dos compostos carcinogénicos N-nitrosos (nitrosaminas ou nitrosamidas), pode resultar da nitrosação de aminas secundárias ingeridas na alimentação por alguns produtos metabólicos dos nitritos no estômago (Du, Zhang, & Lin, 2007). A nitrosação pode ocorrer principalmente em duas situações: antes da ingestão durante o armazenamento e amadurecimento dos produtos alimentares, e no estômago a partir da acção do nitrito salivar produzido através da redução enzimática do nitrato endógeno ou exógeno (McKnight, Duncan, Leifert, & Golden, 1999; Santamaria, 2006).

Desde a descoberta do potencial cancerígeno de N-nitrosodimetilamina em ratos, 14 compostos N-nitrosos mostraram-se cancerígenos em mais de 40 espécies animais, e não há nenhuma razão para suspeitar que os seres humanos sejam exclusivamente resistentes. Assim, a avaliação do risco para a saúde humana de nitratos deve abranger a toxicidade de ambos, os nitritos e compostos N-nitrosos (McKnight, Duncan, Leifert, & Golden, 1999; Santamaria, 2006). Vermeer e colaboradores (1998) mostraram a formação endógena de compostos N-nitrosos cancerígenos (N-nitrosodimetilamina e N-nitrosopiperidina) após a ingestão de nitratos dentro da dose diária aceitável (DDA) em combinação com uma refeição de peixe rica em aminas como precursores nitrosáveis. Os produtos hortícolas utilizados na pesquisa (couve-flor, ervilha, cenoura e feijão verde) tinham baixos teores em nitratos, e o teor médio de vitamina C (um agente antioxidante anticancerígeno) nesses vegetais parecia insuficiente para impedir a formação de nitrosaminas (Vermeer, Pachén, Dallinga, Kleijnans, & Van Maanen, 1998).

Com base em estudos epidemiológicos, experiências em animais e sobre a formação endógena de compostos N-nitrosos, um grupo da Agência Internacional para a Investigação do Cancro (IARC) concluiu que “nitratos e nitritos ingeridos em condições que resultam em nitrosação endógena é provavelmente carcinogénico para humanos (grupo 2A) (Ohshima & Miyoshi, 2010).



Outros estudos mostraram uma possível associação positiva entre o consumo de nitrato de fontes alimentares e de água, e a incidência de cancro da tiróide e hipotireoidismo (Ward, Kilfoy, Weyer, Anderson, Folsom, & Cerhan, 2010).

Os vegetais são conhecidos pelos seus efeitos benéficos, e alguns autores sugerem que isso se deve aos nitratos presentes nos vegetais. O potencial benefício dos nitratos provavelmente se deve à sua conversão em óxido nítrico que possuem uma variedade de benefícios cardiovasculares (Lundberg, Feelisch, Bjorne, Jansson, & Weitzberg, 2006) como a diminuição da pressão arterial, o relaxamento endotelial das veias, inibição da adesão, activação e agregação das plaquetas, protecção contra isquemia e melhoramento da performance física. Os nitratos nos alimentos podem apresentar também um papel importante na protecção contra infecções patogénicas gastrointestinais (Gilchrist, Winyard, & Benjamin, 2010; McKnight, Duncan, Leifert, & Golden, 1999; Santamaria, 2006).

#### 1.1.6. AVALIAÇÃO DE RISCO

A análise do risco para a saúde humana de potenciais agentes perigosos dos alimentos garante uma correcta gestão do risco para a saúde humana. A análise de riscos inclui três componentes: avaliação do risco, gestão do risco, e comunicação do risco.

A avaliação do risco é a avaliação científica dos efeitos adversos na saúde, potenciais ou conhecidos, resultante da exposição humana aos perigos provenientes dos alimentos.

A gestão do risco é o processo de pesagem de alternativas políticas para aceitar, minimizar ou reduzir riscos avaliados e para seleccionar e aplicar opções apropriadas.

A comunicação do risco é um processo interactivo de troca de informações e opiniões sobre o risco entre os avaliadores, os gerentes de risco e outras partes interessadas (WHO).

A avaliação do risco é geralmente dividida em quatro etapas:

- Identificação do perigo: identifica os efeitos nocivos que o agente químico pode causar nos seres humanos. Baseia-se numa revisão profunda de dados de

- toxicidade do produto químico. Os dados são obtidos a partir de estudos *in vivo* (animais), estudos *in vitro* (célula ou tecido), estudos descritivos sobre as populações humanas expostas ao produto químico (estudos epidemiológicos) ou estudos de relações estrutura-actividade (Cascade).
- Caracterização do perigo: identifica o efeito mais grave da substância na saúde e a dose em que a substância começa a tornar-se perigosa para os seres humanos. O nível de efeitos adversos não observados (no-observed-adverse-effect-level, NOAEL) caracteriza a maior concentração ou quantidade de uma substância, encontrada por experimentações ou observações, que não causa nenhuma alteração adversa detectável da morfologia, capacidade funcional, o crescimento, desenvolvimento ou tempo de vida do organismo-alvo, sob condições definidas de exposição. A relação entre a dose e o efeito tóxico é geralmente baseada em dados de animais de laboratório e devem ser considerados factores de segurança com vista a retirar conclusões sobre os possíveis riscos para os humanos. Os factores de segurança devem ter em conta as diferenças de sensibilidade para os efeitos tóxicos da substância entre animais de laboratório e os seres humanos (inter-espécie), bem como as diferenças de sensibilidade entre diferentes indivíduos humanos (intra-espécie). A partir destes estudos é determinada a Dose Diária Aceitável (DDA). Por DDA de um aditivo alimentar entende-se, à luz dos conhecimentos actuais, a quantidade dessa substância que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem qualquer risco apreciável para o Homem e é expressa em miligramas de aditivo por quilograma de peso corporal por dia (mg/kg peso corporal/dia). A DDA é usada para a caracterização do risco ou para o estabelecimento de valores de orientação (Cascade; WHO/FAO, 2009).
  - Avaliação da exposição: visa reunir as informações disponíveis sobre a exposição à substância química em diferentes grupos populacionais (quantidade consumida e teor encontrado nos alimentos). Este estudo estima rotas de exposição humana e as doses de exposição a partir dos dados disponíveis. O resultado da avaliação da exposição é usado para a caracterização de risco (Cascade).
  - Caracterização do risco: avalia a dose do produto químico que causa um efeito nocivo, derivado da avaliação de risco, em relação à quantidade da substância a

que se está exposto, com base na avaliação da exposição. Isso resulta numa conclusão sobre as margens de segurança para o produto químico. A margem de segurança é a margem entre a dose da substância considerada prejudicial para a saúde humana e a dose estimada a que os seres humanos estão expostos. Se a margem de segurança é grande o suficiente, o químico é considerado seguro para a saúde humana. Se a margem de segurança é pequena, devem ser tomadas medidas para reduzir a exposição humana ao agente químico. (Cascade).

A primeira avaliação internacional do risco associado à ingestão de nitratos e nitritos foi conduzida pelo Comité de Peritos Conjunto FAO/WHO para aditivos Alimentares (JECFA) em 1961 (EFSA, 2008). Foi encontrada uma NOAEL de 500 mg/kg de peso corporal para nitrato de sódio, correspondente a 370 mg/kg para nitratos, derivado de estudos em ratos e em cães. O Comité Científico Alimentar analisou os efeitos toxicológicos do nitrato e estabeleceu uma DDA de 0-3,7 mg/kg de peso corporal para nitratos em 1990 (EC, 1992) confirmada em 1995 (EC, 1997) e reconfirmado pelo JECFA numa revisão mais recente em 2002 (EFSA, 2008; FAO/WHO, 2003). A DDA de 3,7 mg/kg de peso corporal é equivalente a 222 mg de nitratos por dia para um adulto de 60 kg (EFSA, 2008).

De modo a fornecer uma estratégia actualizada da gestão do risco da exposição a nitratos para a saúde humana resultantes do consumo de vegetal, a Comissão Europeia solicitou uma avaliação de risco ao Painel dos Contaminantes na Cadeia Alimentar (CONTAM) da Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA) (EFSA, 2008).

Os dados da ingestão de nitratos nos alimentos a nível global foram calculados a partir de dados dos vários países envolvidos. A Tabela 5 apresenta uma estimativa do consumo de nitratos a nível global, a DDA que representam, e as principais fontes de nitratos que contribuem para o consumo total (Santamaria, 2006) (Hambridge, 2003).

**TABELA 5.** Estimativa da ingestão de nitratos de outras fontes além de aditivos alimentares a nível global (DDA baseada num peso corporal médio de 60 kg) (adaptada de (Santamaria, 2006)).

Região	Consumo diário de nitratos (mg/dia)	DDA (µg/mg)	Principais contribuintes para o consumo total (µg/mg)			
			Vegetais	Água	Cereais	Frutas
Médio Oriente	40	200	650	200	100	50
Ásia	28	100	450	300	150	100
África	20	100	300	400	150	100
América Latina	55	250	650	150	50	100
Europa	155	700	900	50	>50	50

#### 1.1.7. LEGISLAÇÃO

A segurança alimentar sempre foi um assunto de grande preocupação entre os consumidores. Os contaminantes são geralmente definidos como qualquer substância química ou biológica não adicionada intencionalmente aos alimentos que podem comprometer a sua segurança. O controlo da presença de contaminantes em alimentos pode ser assegurado através da implementação de boas práticas recomendadas (Davin, Van Egroo, & Galesne, 2010b). De acordo com o Regulamento da Comissão Europeia (CE) N° 1881/2006 foram estabelecidos teores máximos para certos contaminantes dentro dos valores toxicologicamente aceitáveis para certos contaminantes. Este Regulamento estabelece os níveis máximos de certos contaminantes em alimentos, desta forma os produtos que contenham contaminantes acima dos níveis máximos estabelecidos não serão colocados no mercado (CE, 2006c).

As crianças jovens e lactentes constituem um grupo particularmente susceptível aos efeitos adversos dos contaminantes alimentares e por isso a regulamentação também inclui valores para contaminantes em alimentos destinados a esta faixa etária.

Em relação aos nitratos, o Regulamento (CE) N° 1881/2006 fixa os valores máximos para este contaminante em alfaces e espinafres, uma vez que constituem a principal

fonte de consumo de nitratos pelos humanos, e em alimentos à base de cereais transformados e alimentos para bebês destinados a lactentes e crianças jovens. Uma Vez que as condições climáticas têm uma grande influência nos teores de nitratos existentes em certos vegetais, o regulamento fixa limites máximos de nitratos para estes vegetais dependendo da época do ano (Tabela 6), considerando os níveis máximos para espinafre frescos colhidos de 1 de Outubro a 31 de Março (3000 mg  $\text{NO}_3^-/\text{kg}$ ), e para de 1 de Abril a 30 de Setembro (2500 mg  $\text{NO}_3^-/\text{kg}$ ). Os espinafres conservados ou congelados têm um valor máximo de 2000 mg  $\text{NO}_3^-/\text{kg}$ . As alfaces também têm valores diferentes dependendo do modo de cultivo (ao abrigo ou ao ar livre). Para as alfaces, excepto do tipo “Iceberg”, os valores para colheitas de 1 de Outubro a 31 de Março, ao abrigo e ao ar livre, são de 4500 e 4000 mg  $\text{NO}_3^-/\text{kg}$ , respectivamente; e para as colheitas de 1 de Abril a 30 de Setembro, ao abrigo e ao ar livre, 3500 e 2500 mg  $\text{NO}_3^-/\text{kg}$ , respectivamente. As alfaces tipo “Iceberg” têm valores máximos ao abrigo e ao ar livre de 2500 e 2000 mg  $\text{NO}_3^-/\text{kg}$ , respectivamente. O valor máximo de nitratos estabelecido para alimentos à base de cereais transformados e alimentos para bebês destinados a lactentes e crianças jovens (CE, 2006c).

TABELA 6. Teores máximos de nitratos em alguns géneros alimentícios (mg NO<sub>3</sub><sup>-</sup>/kg de alimento) de acordo com o Regulamento (CE) N° 1881/2006 (CE, 2006c).

Nitratos		
Alimentos	Níveis máximos (mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /kg)	
Espinafres frescos ( <i>Spinecea Oleracea</i> )	Colhidos de 1 Outubro a 31 Março	3000
	Colhidos de 1 Abril a 30 Setembro	2500
Espinafres conservados, congelados, ou ultracongelados		2000
Alface fresca ( <i>Lactuca sativa</i> L.) (alface cultivada em estufa e do campo) excluindo alface referida no ponto 1.4	Colhida de 1 Outubro a 31 Março:	
	Alface cultivada em estufa	4500
	Alface do campo	4000
	Colhida de 1 Abril a 30 Setembro:	
	Alface cultivada em estufa	3500
	Alface do campo	2500
Alface do tipo “Iceberg”	Alface cultivada em estufa	2500
	Alface do campo	2000
Alimentos à base de cereais transformados e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens		200

#### 1.1.8. METODOLOGIA ANALÍTICA

Ao longo dos anos, uma variedade de métodos analíticos foram desenvolvidos para a determinação do conteúdo de nitratos nos alimentos, incluindo a espectrofotometria, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), a cromatografia iónica (IC), a cromatografia gasosa (GC), a polarografia e a electroforese capilar (EC). Os métodos de HPLC têm ganhado popularidade na determinação de nitratos por demonstrarem maior sensibilidade, rapidez, e precisão (Chou, Chung, & Hwang, 2003). Os métodos de espectrofotometria são geralmente eficazes na determinação de nitratos nos alimentos (Ayaz, Topçu, & Yurttagul, 2007; Hardisson, Padron, Frías, & Reguera, 1996), mas possuem uma menor sensibilidade para a detecção de quantidades residuais, do que os métodos de HPLC ou IC (Chou, Chung, & Hwang, 2003). A espectrofotometria é

também utilizada na determinação de nitratos nas águas. De Martin e Restani (2003) (De Martin & Restani, 2003) utilizaram um método de IC, que se mostrou um método rápido e eficaz na detecção de nitratos em todos os vegetais usados.

#### 1.1.8.1. HPLC

A cromatografia é um método físico de separação de misturas e identificação dos seus componentes. Este método tem como princípio a separação dos componentes da amostra com base na diferente partição entre a fase móvel, que arrastará os diversos componentes e uma fase estacionária presente na coluna cromatográfica. A interação dos componentes da amostra com estas duas fases é influenciada por diferentes forças intermoleculares e específicos efeitos de afinidade e solubilidade. Os componentes em solução na fase móvel que apresentarem maior afinidade química com a fase estacionária interagem mais fortemente com a mesma, pelo que ficam retidos por um maior período de tempo, sendo assim separados dos restantes compostos que passam mais rapidamente pela coluna (Siouffi, 2000)

O método de HPLC recorre a pressões elevadas, o que permite uma redução no diâmetro das partículas da fase estacionária, existente no interior da coluna cromatográfica. O uso de uma fase estacionária com partículas de menores dimensões (na ordem de 5µm) resulta numa maior área superficial, o que promove uma separação mais eficiente dos componentes da amostra. Esta redução das dimensões das partículas da fase estacionária permite o uso de colunas menores, volumes menores de amostras e um menor gasto de fase móvel, tornando possível trabalhar na faixa dos microlitros.

O aparelho de HPLC é fundamentalmente constituído por reservatórios para a fase móvel, uma (ou mais) bomba (s), injector, coluna de separação, detector e sistema de aquisição de dados, conforme a Figura 4.

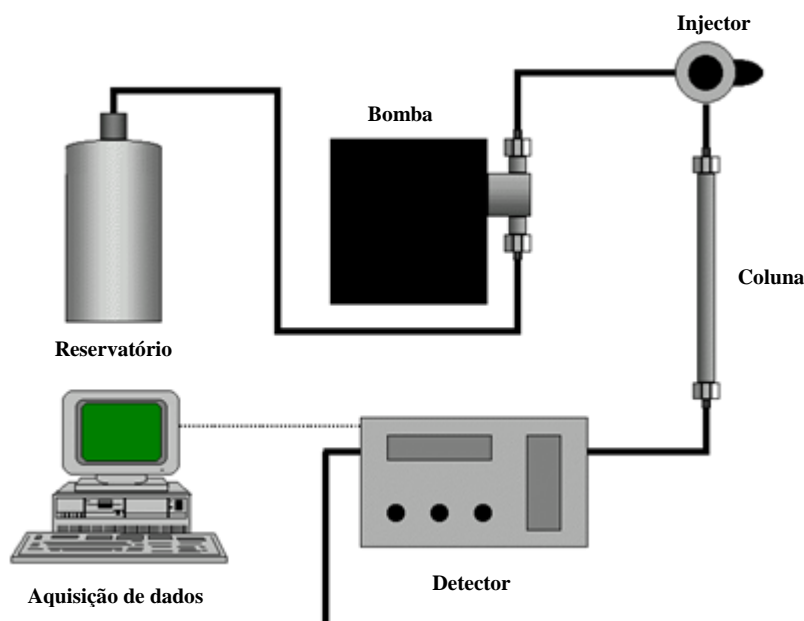


FIGURA 4. Representação esquemática de um aparelho de HPLC.

Nesta técnica o eluente ou fase móvel é alimentado através de uma (ou mais) bomba(s), que assegura(m) a passagem de um caudal controlado do eluente ao longo dos diversos componentes do sistema cromatográfico.

A amostra é injectada através de um injetor automático. A fase móvel, que é continuamente bombeada para a coluna, vai arrastar os componentes da amostra ao longo da mesma. Como consequência da diferente interacção entre a amostra e as duas fases, os componentes irão deslocar-se ao longo da coluna a velocidades diferentes, saindo da coluna separados uns dos outros.

Seguidamente os componentes da amostra saem da coluna arrastados pela fase móvel e passam por um detector que está ligado a um registador (sistema de aquisição de dados) que permite obter automaticamente o sinal enviado pelo detector, o qual é proporcional à concentração do componente na solução.

A representação gráfica do sinal enviado pelo detector em função do tempo que decorreu desde a injeção da amostra na coluna constitui o que se designa por cromatograma, o qual é utilizado para identificar e quantificar os componentes da mistura. O tempo de retenção de cada componente permite a sua análise qualitativa, enquanto que a análise quantitativa é realizada através da área do pico correspondente.



Ambas as análises se realizam através da comparação dos cromatogramas da amostra com os de soluções padrão obtidos em idênticas condições experimentais.

O método de HPLC é geralmente eficaz na quantificação de nitratos tanto em amostras vegetais como em alimentos infantis sendo utilizado em vários estudos (Chou, Chung, & Hwang, 2003; Tamme, Reinik, Roasto, Meremae, & Kiis, 2010; Vasco & Alvito, 2011).

## 1.2. BIOACESSIBILIDADE

### 1.2.1. MODELOS

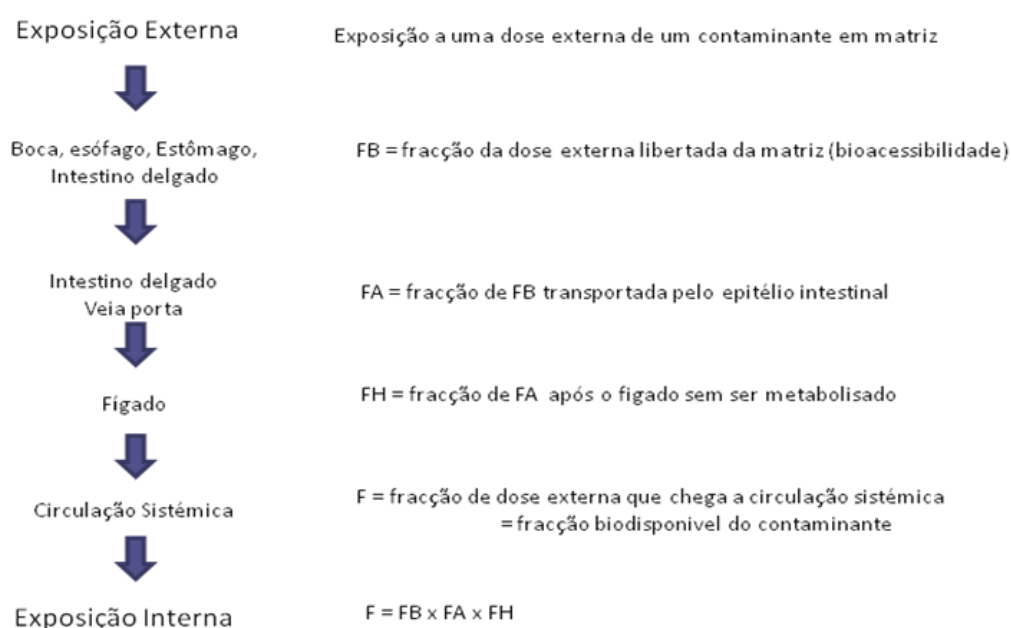
Na avaliação do risco para a saúde humana, a ingestão de alimentos é considerada uma importante forma de exposição a muitos contaminantes, quer contaminantes industriais ou ambientais, quer contaminantes resultantes do processo de produção. A quantidade total de um contaminante ingerido nem sempre reflecte a quantidade que estará disponível para o corpo. Apenas uma certa quantidade do contaminante está biodisponível. O termo biodisponibilidade oral foi definido em Versantvoort e colaboradores (2004) (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004) como a fracção da quantidade total do contaminante ingerida, que representa a dose externa, que chega à circulação sistémica e pode exercer o seu efeito tóxico (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004).

A biodisponibilidade (F) de um composto pode ser subdividida em três processos (Figura 5) (A. G. Oomen, Rompelberg, Bruil, Dobbe, Pereboom, & Sips, 2003; Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004):

- libertação total ou parcial do composto da sua matriz para o lúmen do intestino; a fracção do contaminante que é mobilizado da matriz para o quimo digestivo é a fracção bioacessível ( $F_B$ );

- transporte através do epitélio intestinal para a veia intestinal (transporte intestinal) ( $F_A$ );
- degradação do composto no fígado e intestino (metabolismo) ( $F_H$ ).

A biodisponibilidade ( $F$ ) é, então, o produto da bioacessibilidade ( $F_B$ ), absorção ( $F_A$ ) e metabolismo ( $F_H$ ) (Figura 5) (Versantvoort, Oomen, Van de Kamp, Rompelberg, & Sips, 2005; Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004).



**FIGURA 5.** Representação esquemática dos processos que determinam a biodisponibilidade ( $F$ ) de um contaminante (adaptado de (VERSANTVOORT, VAN DE KAMP, &

Estudos em animais e humanos demonstraram que a biodisponibilidade de compostos existentes nos alimentos pode ser significativamente diferente dependendo do produto alimentar, do processamento dos alimentos ou da sua preparação. Só a fracção do contaminante que é libertada para os sucos digestivos durante o trânsito pelo tracto gastrointestinal estará disponível, bioacessível, para absorção. A matriz em que o contaminante está presente, como por exemplo alimentos, líquidos, solos, brinquedos, pode afectar a biodisponibilidade de um contaminante, mas principalmente a sua

bioacessibilidade, uma vez que a matriz não terá efeitos na absorção e metabolismo do contaminante. O transporte através do epitélio intestinal e o metabolismo no fígado dependem principalmente de propriedades específicas do composto. Por exemplo, a ingestão de um contaminante na matriz alimentar A pode levar a toxicidade enquanto a ingestão da mesma quantidade do contaminante na matriz alimentar B pode não originar toxicidade. Assim, uma melhor compreensão do efeito da matriz na biodisponibilidade de um contaminante pode providenciar uma avaliação mais precisa do risco para a saúde humana (Versantvoort, Oomen, Van de Kamp, Rompelberg, & Sips, 2005; Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004). Pode-se considerar a bioacessibilidade de um contaminante como um indicador para a biodisponibilidade máxima do contaminante, que pode ser usado na avaliação de risco de um contaminante num produto, e apenas a bioacessibilidade determinada no quimo do intestino delgado é relevante para a avaliação de risco (Brandon, Oomen, Rompelberg, Versantvoort, van Engelen, & Sips, 2006).

A quantificação da biodisponibilidade e bioacessibilidade é dificultada, muitas vezes, por processos complexos da digestão. A técnica *in vitro* é preferida aos estudos *in vivo*, pois reduz a necessidade de experimentação em animais e utiliza um procedimento simples, reprodutível e padronizado (Fernández-García, Carvajal-Lérida, & Pérez-Gálvez, 2009). A bioacessibilidade no tracto gastrointestinal é um processo dinâmico que muda de acordo com as condições fisiológicas. Com os modelos de digestão *in vitro* o processo digestivo no tracto gastrointestinal é simulado de maneira simplificada aplicando condições baseadas na fisiologia humana, isto é, a composição química dos fluidos digestivos, o pH e os períodos de tempo de residência em cada compartimento. A maioria dos modelos de digestão *in vitro* descreve um procedimento de duas (estômago e intestino delgado) ou três etapas (boca, estômago e intestino delgado), uma vez que estes compartimentos são os mais prováveis para determinação da bioacessibilidade, e esta é principalmente determinada no quimo do intestino delgado, (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004).

A Figura 6 apresenta diferentes modelos de digestão *in vitro* referidos por Oomen e colaboradores (2003b) (A. G. Oomen, van Twillert, Hofhuis, Rompelberg, & Versantvoort, 2003) para estudos de bioacessibilidade de chumbo em brinquedos, e por Brandon e colaboradores (2006) (Brandon, Oomen, Rompelberg, Versantvoort, van Engelen, & Sips, 2006) para estudo da bioacessibilidade de chumbo, ftalatos, ácido

benzóico e corantes azo, em diferentes matrizes. Estes modelos simulam diferentes cenários de exposição infantil a contaminantes, assim como os processos de digestão de cada modelo e os tempos de incubação em cada compartimento. Estes modelos podem ser usados na avaliação de risco para um cenário de exposição mais adequado. O delineamento experimental do modelo de digestão *in vitro* é ajustável de acordo com os avaliadores de risco para cenários de exposição específicos, de modo a que os resultados do modelo sejam úteis para uma avaliação do risco para as crianças mais realista. As principais diferenças entre os modelos referem-se ao tipo de matriz, ao pH do estômago e ao volume e composição dos sucos digestivos (Brandon, Oomen, Rompelberg, Versantvoort, van Engelen, & Sips, 2006; A. G. Oomen, van Twillert, Hofhuis, Rompelberg, & Versantvoort, 2003).

O modelo de sucção foi descrito por Oomen e colaboradores (2003b) (A. G. Oomen, van Twillert, Hofhuis, Rompelberg, & Versantvoort, 2003) e é aplicado para simular o acto de sucção de um produto por uma criança. O contaminante é libertado da matriz para a saliva, podendo o contaminante ser analisado directamente na saliva ou seguir com a digestão e analisar a fracção disponível para absorção no intestino delgado. O tempo de sucção depende da criança e do produto, pelo que o tempo aplicado após adição da saliva pode ser variável. O modelo de sucção-deglutição, também descrito por Oomen e colaboradores (2003b) (A. G. Oomen, van Twillert, Hofhuis, Rompelberg, & Versantvoort, 2003) é aplicado para simular a sucção, seguida da ingestão (deglutição) de um determinado produto (Brandon, Oomen, Rompelberg, Versantvoort, van Engelen, & Sips, 2006).

O modelo de deglutição descrito por Oomen e colaboradores (2003b) (A. G. Oomen, van Twillert, Hofhuis, Rompelberg, & Versantvoort, 2003) simula determinação da bioacessibilidade após ingestão de um determinado produto. Este modelo pode ter duas variantes: o de deglutição em jejum em que se aplica o modelo para simular a ingestão em condição de jejum, e o de deglutição após a ingestão de alimentos. A ingestão de alimentos leva a alterações no trato gastrointestinal devido à secreção de ácido gástrico, biliar e fluidos pancreáticos, e a modificação nos padrões de mobilidade gástrica e intestinal. Por isso tornou-se necessário adaptar o modelo de ingestão em jejum para melhor simular os processos de digestão no tracto gastrointestinal após a ingestão de alimentos. Versantvoort e colaboradores (2004) (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004), desenvolveram um modelo de digestão *in vitro* para determinar a

bioacessibilidade de contaminantes que simula o processo digestivo após a ingestão de alimentos conforme se esquematiza na Figura 6 (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004).

No estudo realizado por Oomen e colaboradores (2003b) (A. G. Oomen, van Twillert, Hofhuis, Rompelberg, & Versantvoort, 2003), estes autores verificaram que a bioacessibilidade era sempre mais baixa no modelo de sucção uma vez que neste a matriz não é ingerida, e conseqüentemente o chumbo pode ser libertado apenas na boca e não sofre a acção dos sucos no estomago e intestino delgado como acontece para os modelos de sucção-deglutição e de deglutição.

A saliva é secretada continuamente na boca mesmo em repouso. A entrada de um alimento na boca estimula a produção da saliva, aumentando o fluxo e alterando a sua composição química e enzimática. As condições da saliva estimulada são aplicadas a todos os modelos digestão *in vitro* descritos na Figura 6 (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004).

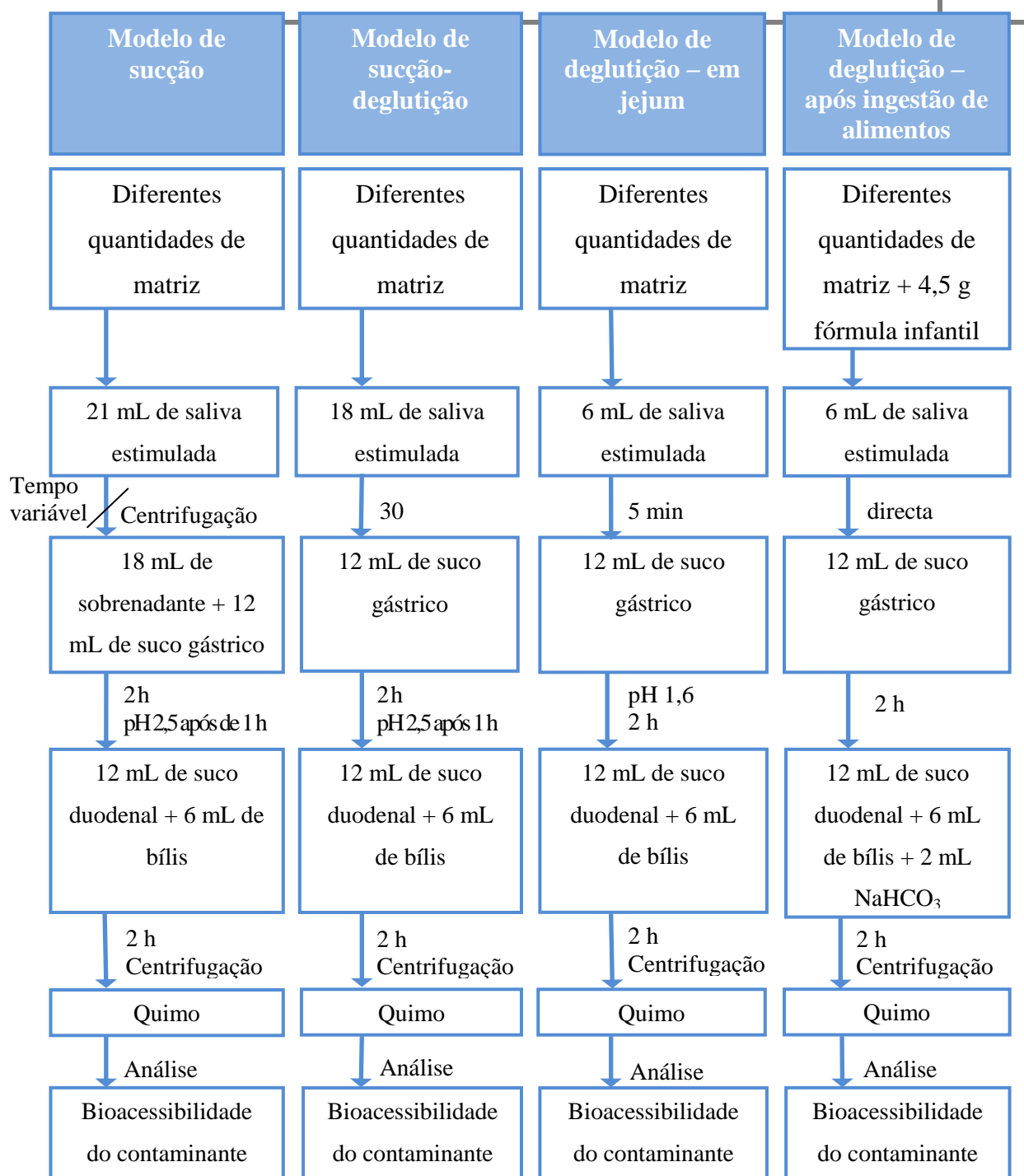


FIGURA 6. Representação esquemática dos modelos de digestão *in vitro*: modelo de sucção, modelo de sucção-deglutição, modelo de deglutição em jejum e após ingestão de alimentos.

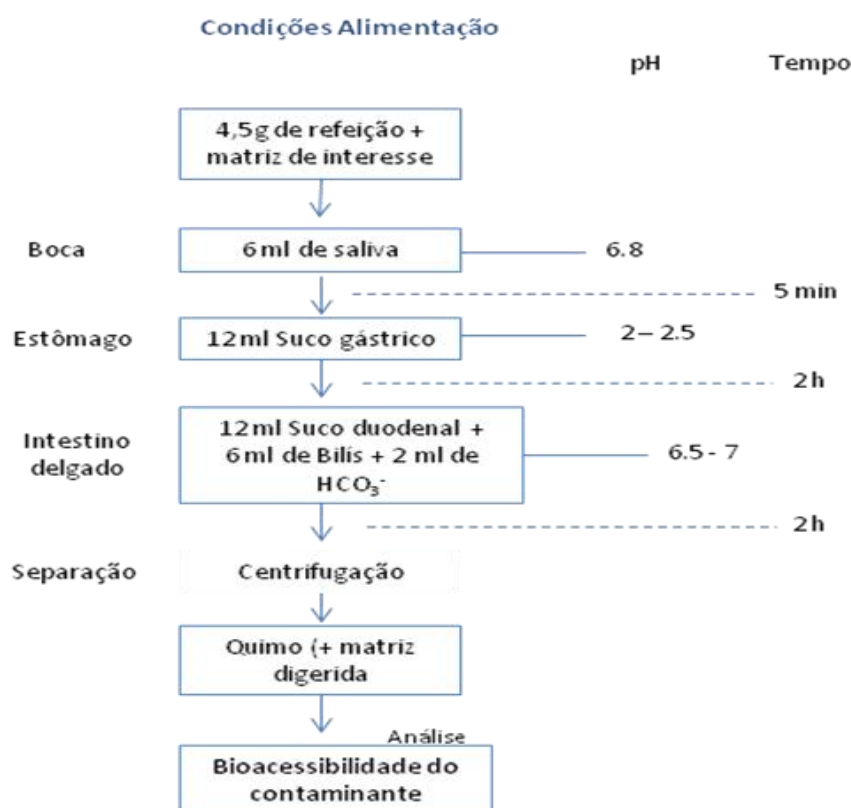


FIGURA 7. Representação esquemática das condições experimentais de um modelo de digestão *in vitro* simulando o processo digestivo após ingestão de alimentos (adaptado de (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004)).

O estudo de Oomen e colaboradores (2002) (A. G. Oomen, Hack, Minekus, Zeijdner, Cornelis, Schoeters, et al., 2002), que descreve a aplicação um procedimento de três fases de digestão *in vitro* em cinco modelos, na ingestão de alguns contaminantes do solo (chumbo, arsênio e cádmio), propõe adaptações ao modelo de digestão *in vitro* referentes à composição, volume e tempo de incubação de cada fase. Versantvoort e colaboradores (2004) (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004) descrevem as modificações que podem ocorrer após ingestão de alimentos em que um aumento de proteína provoca um aumento da secreção de enzimas proteolíticas do pâncreas, enquanto um aumento na ingestão de amido ou lípidos induz aumento da secreção de amilase e lipase, respectivamente. Assim, as características da digestão *in vitro*, tais como tempo de digestão, o conteúdo enzimático, ou a composição das enzimas devem ser ajustadas de acordo com características da amostra. Por exemplo, se a concentração da substância-alvo (proteínas, lípidos, ou hidratos de carbono) é aumentada, então a

concentração de enzimas ou o tempo de digestão devem ser aumentados, mesmo que o resto do processo de digestão *in vitro* seja mantido.

### 1.2.2. PROCESSO DIGESTIVO

Para melhor compreensão do modelo de digestão, inclui-se um resumo das mudanças desencadeadas pela ingestão de alimentos nas várias etapas do processo digestivo (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004).

Na boca:

- Saliva: após estimulação, o fluxo de saliva aumenta 3 a 4 vezes com máximos de 10 mL/min. A sua composição varia, aumentando as concentrações de sódio, cálcio, cloro, bicarbonato e amilase, e diminuindo as concentrações de fosfato e mucina.

No estômago:

- Tempo de residência: o esvaziamento gástrico é determinado por três factores: o volume da comida, a sua pressão osmótica e o conteúdo calórico do alimento (2 kcal/min), variando de 60 a 277 conforme a comida for mais fluida ou mais sólida, respectivamente, e dependendo da concentração calórica.
- pH gástrico: ao ingerir um alimento o pH gástrico aumenta de 1,5-2 (em jejum) para 3-7. Durante o esvaziamento do estômago, o pH diminui gradualmente até ser restabelecido o pH do estado de jejum (1-2 horas depois da ingestão).

No intestino delgado:

- Secreção de bílis: o saco biliar contrai-se em reacção à gordura que entra no duodeno, aumentando a concentração de bílis no duodeno em pico e depois estabilizando a uma concentração constante mais baixa. A quantidade de bílis depende da quantidade de gordura no duodeno. A concentração de bílis aumenta de 1,5-5 mM (em jejum) para 7-15 mM depois da ingestão de um alimento.
- Sucos pancreáticos: são secretados em resposta ao quimo semi-sólido no duodeno. O bicarbonato é secretado para neutralizar a quantidade de ácido a entrar o duodeno, e as enzimas começam a digestão dos alimentos.



- Tempo de residência: os tempos de trânsito pelo intestino delgado não variam muito entre os estados de jejum e após ingestão, sendo o tempo de trânsito médio por volta de 3 horas (1 a 6 horas).
- pH intestinal: os valores de pH aumentam gradualmente entre o duodeno e o íleo, de pH 5.5 a 7.5. O pH no duodeno aumenta depois da ingestão de um alimento.

### 1.2.3. ESTUDOS DE BIOACESSIBILIDADE DE CONTAMINANTES

Vários estudos mostraram que é tecnicamente possível determinar a bioacessibilidade de contaminantes de alimentos, solo e matrizes de brinquedos com um modelo de digestão *in vitro*. Os resultados de vários estudos mostraram, na maioria dos casos, que apenas uma fracção dos contaminantes foi libertada da matriz durante a digestão, logo, a exposição interna ao contaminante é menor que a exposição externa (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004). Versantvoort e colaboradores (2005) (Versantvoort, Oomen, Van de Kamp, Rompelberg, & Sips, 2005) estudaram a aplicação do modelo de digestão *in vitro* de três fases para a determinação da bioacessibilidade de aflatoxina B<sub>1</sub> e ocratoxina A em pasta de amendoim e em trigo-sarraceno, respectivamente. Os autores verificaram uma bioacessibilidade média de 94% para a aflatoxina B<sub>1</sub> e 100% para a ocratoxina A, o que indica que estas micotoxinas são totalmente libertadas da matriz alimentar durante o trânsito intestinal (Versantvoort, Oomen, Van de Kamp, Rompelberg, & Sips, 2005). Um estudo mais recente desenvolvido por Kabak e colaboradores (2009) (Kabak, Brandon, Var, Blokland, & Sips, 2009) sobre a eficácia de certas bactérias probióticas na redução da bioacessibilidade de aflatoxina B<sub>1</sub> e ocratoxina A, encontraram bioacessibilidades médias de 30% da ocratoxina em amostras de trigo-sarraceno e 90% da aflatoxina em amostras de pistachio.

Versantvoort e colaboradores (2004) (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004) reportaram um estudo realizado sobre a bioacessibilidade do cádmio em alfaces e rabanetes, que mostrou que a maioria deste contaminante, mas não todo, foi mobilizado da matriz para os sucos durante o processo de digestão. A bioacessibilidade do cádmio nas alfaces foi ligeiramente inferior, entre 49% e 63%, em relação à bioacessibilidade

de rabanete que se situou entre 63% e 74% (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004).

Meca e colaboradores (2011) (Meca, Mañes, Font, & Ruiz, 2011) estudaram a digestão *in vitro* das micotoxinas eniatinas em pão de trigo comercial, obtendo uma bioacessibilidade média deste contaminante de 80%.

Tao e colaboradores (2009) (Tao, Lu, Zhang, Yang, Yang, X., et al., 2009) estudaram a bioacessibilidade de pesticidas organoclorados em quatro tipos de solo, e encontraram valores de bioacessibilidade compreendidos entre 4% e 97%, dependendo das propriedades do solo e dos compostos.

Foi também efectuado um estudo sobre a biodisponibilidade *in vivo* de nitratos por van Velzen e colaboradores (2008) (van Velzen, Sips, Schothorst, Lambers, & Meulenbelt, 2008), através da administração de nitratos por via intravenosa ou por consumo de espinafre e beterraba cozidas e alface crua. Estes autores concluíram que os nitratos presentes em legumes, quer estejam cozidos ou não, são absorvidos de forma muito eficaz, resultando em uma biodisponibilidade absoluta dos nitratos de cerca de 100%. A biodisponibilidade de nitritos foi estudada por Hunault e colaboradores (2009) (Hunault, van Velzen, Sips, Schothorst, & Meulenbelt, 2009) após administração oral de nitritos em humanos, em jejum, a diferentes concentrações. A biodisponibilidade média foi de 97%.

Os estudos de bioacessibilidade e biodisponibilidade podem também ser aplicados a outros compostos alimentares que não sejam contaminantes, como por exemplo na determinação da eficiência de nutrientes e minerais importantes. Sahuquillo e colaboradores (2003) (Sahuquillo, Barberá, & Farré, 2003) estimaram a bioacessibilidade de ferro, cálcio e zinco em três legumes (feijão branco, lentilhas e grão-de-bico), e verificaram percentagens de bioacessibilidade dependentes do tipo de matriz, com valor entre 11% e 60% para o ferro, entre 22% e 47% para o cálcio, e entre 54% e 78% para o zinco.

## 2. OBJECTIVOS

Devido aos efeitos nocivos que os nitratos podem ter na saúde humana, em particular nos lactentes e crianças jovens, considerou-se importante complementar os estudos de monitorização efectuados sobre a ocorrência de nitratos em alimentação infantil, sua estabilidade a diferentes temperaturas de armazenamento, e estudar, pela primeira vez, a bioacessibilidade de nitratos em produtos de alimentação infantil aplicando um modelo de digestão *in vitro*. Com este estudo pretende-se contribuir com uma avaliação mais precisa da exposição humana a nitratos em alimentos.

O presente estudo teve como objectivos principais:

- A determinação analítica do teor de nitratos por HPLC-UV em amostras de alimentos preparados para lactentes e crianças.
- Estudos de estabilidade de nitratos nas amostras de alimentos infantis durante diferentes períodos de armazenamento às temperaturas de 4 e -20°C.
- Comparação do teor de nitratos em alimentos infantis de origem biológica e convencional.
- Estudos de bioacessibilidade de nitratos em alimentos infantis.

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1. AMOSTRAS

Foram adquiridas 20 amostras de alimentos preparados para crianças à base de vegetais contendo carne ou peixe (10 de origem biológica e 10 convencional), de 7 marcas diferentes, em supermercados, farmácias e lojas de produtos biológicos na região de Lisboa (Anexo I).

Para obter uma amostra representativa foram adquiridas amostras do mesmo lote suficientes para perfazer uma quantidade mínima de 600 g (Alvito, Martins, Vasco, Santiago, Furtado, Oliveira, et al., 2010). As amostras foram conservadas nos recipientes originais de vidro ou de plástico em vácuo à temperatura ambiente, e encontravam-se em bom estado de conservação e dentro do prazo de validade.

Recipientes da mesma amostra e lote foram homogeneizados manualmente ou em homogeneizadores Grindomix (conforme contivessem ou não pedaços inteiros de alimentos) de modo a se obter uma composição homogénea em toda a amostra.

As amostras foram analisadas para determinação do teor de nitratos de imediato após abertura dos recipientes ou até no máximo no dia seguinte. O excedente das amostras foi subdividido em alíquotas de dimensão conveniente em saquetas de plástico e conservadas em vácuo a 4°C e -20°C.

O valor obtido nesta análise foi considerado como o valor de referência (para a ocorrência de nitratos) com o qual os valores de estabilidade e de bioacessibilidade foram comparados.

### 3.2. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE NITRATOS

#### 3.2.1. FUNDAMENTO DO MÉTODO

O método de determinação de nitratos usado neste estudo encontra-se validado e baseia-se na extracção do nitrato com água fervente e solução de bórax, e remoção de substâncias interferentes com reagentes de Carrez. As determinações e quantificações do ião  $\text{NO}_3^-$  foram efectuadas por HPLC com coluna de troca iónica e detecção por Ultravioleta (UV) segundo um procedimento interno do Departamento de Alimentação e Nutrição (DAN), INSA, baseado no trabalho de Hunt e Seymour (1985) (Hunt & Seymour, 1985) e na norma EN 12014-2 (EN).

O estudo da curva de calibração entre 1 e 10  $\mu\text{g/mL}$  (1, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ) mostrou que o método apresentou linearidade para o intervalo estudado e uma gama de trabalho bem definida. Os valores do limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) da curva de calibração foram de 0,1 e 0,3  $\mu\text{g/mL}$  reflectindo níveis de nitrato de 1 e 3  $\text{mg/kg}$ , respectivamente. Para fins práticos, o primeiro ponto da curva de calibração (1  $\mu\text{g/mL}$ ) foi considerado para o cálculo do limite de quantificação do método equivalente a 10  $\text{mg/kg}$  (Vasco & Alvito, 2011).

#### 3.2.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

##### 3.2.2.1. Reagentes

Os reagentes usados foram os seguintes:

- Água ultrapura Milli-Q, Millipore.
- Acetonitrilo,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , para HPLC, Merck, 99,90%, CAS Number 75-05-8.
- Fosfato de potássio monobásico anidro,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , p.a., Merck, 99%, CAS Number 7778-77-0.
- Ácido ortofosfórico,  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , p.a., Merck, 84,5%, CAS Number 7664-38-2.

- Nitrato de potássio,  $\text{KNO}_3$ , puríssimo, Merck, 99,99%, CAS Number 7757-79-1.
- Nitrato de sódio,  $\text{NaNO}_3$ , puríssimo, Merck, 99,99%, CAS Number 7631-99-4.
- Hexacianoferrato (II) de potássio trihidratado,  $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6] \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ , p.a., Merck, 99,0%-102,0%, CAS Number 14459-95-1.
- Sulfato de zinco heptahidratado,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Merck, p.a. 99,5%-103,0%, CAS Number 7446-20-0.
- Tetraborato de sódio,  $\text{NaB}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ , Merck, p.a. 98%, CAS Number 1330-43-4.

### 3.2.2.2. Soluções

Para a preparação das soluções foi utilizada água ultrapura.

- Solução de bórax saturada: foram dissolvidos mais de 1g de tetraborato de sódio por cada 16 mL de água.
- Solução de carrez I a 15%: foram dissolvidos, num balão volumétrico de 1000 mL, 15g de hexacianoferrato (II) de potássio trihidratado com água e completado o volume com água.
- Solução de carrez II a 30%: foram dissolvidos, num balão volumétrico de 1000 mL, 30g de sulfato de zinco com água e completado o volume com água.
- Solução tampão fosfato (fase móvel) (0,045 M, pH 3,0), foram pesados 10,8872 g de fosfato de potássio monobásico anidro e dissolvidos num copo de 2 L com água ultrapura. O pH foi acertado com ácido ortofosfórico. A solução foi então transferida para um balão volumétrico de 2 L, completado o volume com água ultrapura, filtrada com filtro orgânico e desgaseificada.

#### 3.2.2.2.1. Soluções Padrão

Para a identificação e quantificação dos nitratos nas amostras foram feitas as seguintes soluções padrão:

- A solução-mãe padrão de referência foi obtida diluindo 0.1630g de  $\text{KNO}_3$  em fase móvel, num balão de 100 mL, perfazendo com fase móvel para ter a

concentração de 1 mg/mL. A solução intermédia de referência foi feita diluindo 1 mL da solução-mãe de padrão de referência com fase móvel para um balão de 100 mL para obter a concentração de 10 µg/mL. Para as soluções padrão de referência diluiu-se 1, 2, 4, 6, e 8 mL da solução intermédia de referência em fase móvel perfazendo 10 mL, obtendo-se as concentrações de 1, 2, 4, 6 e 8 µg/mL, respectivamente.

- A solução-mãe padrão de controlo foi obtida diluindo 0.1371g de  $\text{NaNO}_3$  em fase móvel, num balão de 100 mL, perfazendo com fase móvel para uma concentração de 1mg/mL. A solução intermédia de controlo foi feita diluindo 1 mL da solução-mãe de padrão de controlo com fase móvel para um balão de 100 mL obtendo-se a concentração de 10 µg/mL. As soluções padrão de controlo foram obtidas diluindo 2 e 6 mL da solução intermédia de controlo em fase móvel perfazendo em balões de 10 mL, obtendo-se as concentrações de 2 e 6 µg/mL, respectivamente.

A curva de calibração foi obtida a partir dos seis pontos com as concentrações de padrão de referência de 1, 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL. A solução padrão de controlo foi usada para confirmação da curva de calibração com dois pontos com concentrações de 2 e 6 µg/mL.

### 3.2.3. MATERIAIS

- Balões volumétricos.
- Barcos de pesagem.
- Criotubos.
- Erlenmeyers.
- Espátulas de pesagem.
- Vials de 2 mL.
- Frascos de vidro.
- Funis.

- Pipeta graduada.
- Pompets.
- Proveta.
- Seringa com capacidade de 10 ml.
- Termómetro.
- Frascos de kitasato para filtração.
- Filtro orgânico de 0.45 µm para filtração da fase móvel.
- Filtros de papel.
- Filtros de Politereftalato de etileno (PET) de 0.45 µm.

#### 3.2.4. EQUIPAMENTOS

- Balança analítica, Mettler Toledo.
- Banho de água termostatzado para temperaturas até 100°C, com sistema de condensação incorporado, Trade Raypa.
- Coluna de HPLC, com coluna de troca aniónica forte, Hypersil Sax, com 5µm de porosidade e 25 cm de comprimento por 4.6 de diâmetro.
- Congelador a -20°C.
- Frigorífico a 4°C.
- Homogeneizador Grindomix.
- Placa de aquecimento, IKA-Combimag RCT.
- Potenciómetro 827 pH Lab, Metrohm.
- Sistema HPLC, Waters Aliance Separation Module 2695, com detector de UV, Photodiodes Waters 2996.
- Sistema de desgaseificação, Branson.



### 3.2.5. PROCEDIMENTOS

#### 3.2.5.1. Preparação das amostras

Cada amostra foi analisada em duplicado e para o estudo da ocorrência uma terceira toma foi fortificada com solução-mãe de padrão de referência (0,4 mL de solução-mãe de padrão de referência 1mg/mL), para determinação da recuperação.

Foram pesadas, numa balança analítica, aproximadamente 10 g de alimento, para erlenmeyers de boca esmerilada de 200 mL. A cada toma de amostra foram adicionados 100 mL de água ultrapura aquecida a aproximadamente 70°C e 5 mL de solução bórax saturada. De seguida o erlenmeyer com a solução foi levado a um banho fervente, com sistema de condensação, durante 15 minutos. Logo depois de retirado do banho, adicionou-se 10 mL de solução de Carrez I, agitou-se e adicionou-se de seguida 10 mL de solução de Carrez II, agitou-se novamente e deixou-se arrefecer. Após o arrefecimento, transferiu-se a solução do erlenmeyer para balão volumétrico de 200 mL com ajuda de um funil e completou-se o volume com água ultrapura. A solução foi filtrada com papel de filtro com pregas através de um funil para um erlenmeyer de 500 mL. Filtrou-se novamente com filtro PET de 0,45 µm, usando seringas de 10 mL, e o filtrado foi reservado em frasco de polipropileno. As diluições da amostra, foram efectuadas a partir desta solução, para balões volumétricos de capacidade adequada até obtenção do teor de  $\text{NO}_3^-$  adequado à curva de referência. Retirou-se a quantidade suficiente da solução amostra para um vial de vidro de 2 mL para o injector automático do sistema Waters.

### 3.2.6. CROMATOGRAFIA

#### 3.2.6.1. CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS

As condições cromatográficas foram as mesmas para todas as análises:

- Fase estacionária: coluna de troca aniónica forte Hypersil Sax.

- Fase móvel: Tampão fosfato (0,045 M, pH 3,0).
- Fluxo: 1 mL/min.
- Volume de injeção: 20 µL (no caso das concentrações de nitratos obtidas se situarem fora da gama de trabalho, fizeram-se injeções de amostras com volumes compreendidos entre 10 e 200 µL, e introduziu-se o factor de correcção correspondente na folha de cálculo dos resultados).
- Comprimento de onda de detecção: 210 nm.
- Temperatura do forno da coluna: 37 °C.
- Temperatura da câmara das soluções de amostra a injectar: 15 °C.
- Tempo de corrida:  $\pm 8$  min para padrões e  $\pm 15$  min para amostras.

#### 3.2.6.2. Análise das amostras

As soluções padrão de referência e de controlo foram feitas diariamente e injectadas com as soluções de amostra para análise em cada série de trabalho. Foram efectuadas duas injeções de cada uma das soluções e procedeu-se à análise cromatográfica.

#### 3.2.6.3. Identificação

O ião  $\text{NO}_3^-$  nas amostras foi identificado por comparação dos tempos de retenção (TR) dos picos obtidos nos cromatogramas das soluções de padrão de referência e das amostras. A confirmação dos TR foi efectuada através dos ensaios de recuperação.

#### 3.2.6.4. Quantificações

A quantificação baseou-se num método de padrão externo multi-nível. As curvas de calibração foram calculadas pelo método dos mínimos quadráticos através do software “Empower” do equipamento de cromatografia.

A concentração de nitratos nas amostras foi calculada por interpolação das respectivas áreas dos picos com a curva de calibração e considerando a massa da toma da amostra e as possíveis diluições efectuadas.

#### 3.2.6.5. Tratamento dos resultados

Os critérios de aceitação das curvas de calibração utilizadas para o cálculo da concentração das amostras incluíram um coeficiente de correlação da curva  $r \geq 0,995$  e valores de desvio padrão dos pontos em relação à recta  $\leq 10\%$ .

O cálculo da concentração de nitrato em mg/kg de amostra foi efectuado utilizando uma folha de cálculo interna INSA (Anexo II), segundo a Equação 2:

$$Nit = \frac{S_{inj} \times V_{dil}}{m \times d} \times 100$$

**EQUAÇÃO 2.** Equação usada na determinação concentração de nitrato na amostra a partir da concentração da solução analisada no programa Empower.

Sendo:

Nit = Concentração final de Nitrato na amostra (mg/kg)

$S_{inj}$  = Concentração da solução analisada no crómatografo ( $\mu\text{g/mL}$ )

$V_{dil}$  = Volume em que a toma de amostra foi diluída (mL)

m = Massa da toma de amostra (g)

d = Diluição efectuada na solução para análise

Para verificação da distribuição Gaussiana dos resultados da concentração de nitratos nas amostras foi utilizado um teste de Shapiro-Wilk para um nível de significância de 5% (ISO 5479 1997) (Vasco & Alvito, 2011).

As análises estatísticas para comparação das amostras de alimentos infantis de origem biológica e de origem convencional foram efectuada em Excel aplicando o teste F (Fisher) para avaliar a homogeneidade das variâncias e o teste t de student para avaliar a existência de diferenças significativas entre as médias dos teores de nitratos das amostras de ambas as origens (para um  $p=0,05$ ).

### 3.3. ESTUDOS DE REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMÉDIA

Para calcular os coeficientes de variação da repetibilidade e da precisão intermédia do método, foram efectuados estudos de repetibilidade usando a amostra de alimento infantil “legumes e massa”. Para tal foram realizadas 3 séries de análise com 6 tomas da amostra cada, nas mesmas condições mas em dias diferentes determinação quantitativa de nitratos.

A repetibilidade é definida pelo Regulamento (CE) 1882/2006 (CE, 2006d) como o valor abaixo do qual se pode esperar que o valor absoluto da diferença entre os resultados de dois testes determinados, obtidos em condições de repetibilidade, nomeadamente a mesma amostra, o mesmo operador, os mesmos aparelhos, o mesmo laboratório e um intervalo curto, se situe, dentro de limites específicos de probabilidade (normalmente 95%), de acordo com a seguinte Equação 3:

$$r = 2,8 \times SD_r$$

**EQUAÇÃO 3.** Equação de cálculo da repetibilidade de acordo com o Regulamento (CE) 1882/2006 (CE, 2006d)

Sendo:

$r$  = repetibilidade (%)

$SD_r$  = desvio padrão da repetibilidade

### 3.4. ESTUDOS DE ESTABILIDADE

As amostras para a determinação da estabilidade de nitratos a 4°C e a -20°C foram analisadas durante um período compreendido entre 1 e 4 semanas, e 1 e 3 meses, respectivamente. Os valores de nitratos obtidos em cada estudo de estabilidade foram comparados com o valor de ocorrência da amostra correspondente, tendo em conta o coeficiente de variação da precisão intermédia do método (8%) para alimentos para criança à base de vegetais.. Para cada amostra foi calculado o desvio padrão respectivo (Equação 4). O valor máximo de nitratos na amostra foi calculado adicionando o valor do desvio padrão ao valor de ocorrência (Equação 5). O valor mínimo de nitratos na amostra foi calculado subtraindo o valor do desvio padrão ao valor de ocorrência (Equação 6). Os teores de nitratos obtidos no estudo da estabilidade que se encontravam abaixo do valor mínimo foram considerados como instáveis.

$$SD = Vo \times CV_{pi}/100$$

EQUAÇÃO 4. Cálculo do desvio padrão da amostra a partir do coeficiente de variação da precisão intermédia.

$$V_{max} = Vo + SD$$

EQUAÇÃO 5. Cálculo do valor máximo de nitratos na amostra

$$V_{min} = Vo - SD$$

EQUAÇÃO 6. Cálculo do valor mínimo de nitratos na amostra

Sendo:

V<sub>max</sub> = valor máximo da amostra (mg/kg)

V<sub>min</sub> = valor mínimo da amostra (mg/kg)

SD = Desvio padrão

V<sub>o</sub> = valor de ocorrência da amostra (mg/kg)

CV<sub>pi</sub> = coeficiente de variação da precisão intermédia (8%)

### 3.5. ESTUDOS DE BIOACESSIBILIDADE

#### 3.6.1. FUNDAMENTO DO MÉTODO

O modelo da digestão *in vitro* usado neste trabalho descreve um processo de três etapas simulando a digestão na boca, estômago, e intestino delgado de acordo com o método descrito por Versantvoort e colaboradores (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004) após a ingestão do alimento aplicando condições baseadas na fisiologia humana, isto é, composição química dos fluidos digestivos, pH e períodos de tempo de residência para cada compartimento.

#### 3.5.2. REAGENTES E SOLUÇÕES

##### 3.5.2.1. REAGENTES

Na digestão *in vitro* foram utilizados vários reagentes para preparar os sucos digestivos, identificados como fase inorgânica, orgânica e enzimática.

Na preparação da fase inorgânica dos sucos digestivos foram utilizados os seguintes reagentes, todos de grau analítico p.a.:

- Cloreto de sódio, NaCl, Merck, 99,5%, CAS Number 7647-14-5.
- Tiocianato de potássio, KSCN, Merck, 98%, CAS Number 333-20-0.
- Cloreto de potássio, KCl, Merck, 99,5%, CAS Number 7447-40-7.
- Cloreto de cálcio dihidratado,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , Merck, CAS Number 10035-04-8.
- Cloreto de amônia,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , Merck, CAS Number 12125-02-9.
- Hidrogenocarbonato de sódio,  $\text{NaHCO}_3$ , Merck, CAS Number 144-55-8.
- Cloreto de magnésio hexahidratado,  $\text{MgCl}_2$ , Merck, CAS Number 7791-18-6.
- Hidróxido de sódio NaOH, Merck, CAS Number 1310-73-2.
- Hidrogenofosfato de potássio,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , Baker, ref. 0240.
- Dihidrogenofosfato de sódio anidro  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , Baker, ref. 0306.
- Sulfato de sódio,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , Merck, 99,99%, CAS Number 7757-82-6.
- Ácido clorídrico, HCl, Merck, 37%.

As fases orgânicas foram elaboradas com os seguintes reagentes, todos de grau analítico p.a.:

- Ureia, Merck, CAS Number 57-13-6.
- D (+) glucose, Merck, CAS Number 50-99-7.
- D (+) glucosaminahidroclorido, Calbiochem. 99,5% CAS Number 66-84-2
- Ácido D-glucorónico, Fluka, >97%, CAS Number 6556-12-3.
- Ácido úrico, VWR Prolabo, 99% CAS Number 69-93-2.

As enzimas digestivas utilizadas foram, todos de grau analítico p.a.:

- Pancreatina, Merck, CAS Number 8049-47-6.
- Pepsina, Merck, CAS Number 9001-75-6.
- Albumina sérica de bovino, Merck, 98%, CAS Number 90604-29-8.

- Lipase de pâncreas suíno, Sigma, tipo II, CAS Number 9001-62-1.
- Bilis bovina, Sigma, CAS Number 8008-63-7.
- $\alpha$ -amilase de bacillus sp, Sigma, CAS Number 9000-90-2.
- Mucina, Carl Roth, 75-95%, CAS Number 91053-71-3.

### 3.5.2.2. SOLUÇÕES

Todas as soluções foram efectuadas usando água ultrapura.

- Solução hidrogenocarbonato de sódio (1 M). Foram pesados 8,4 g de hidrogenocarbonato de sódio e diluídos, num balão de 100 mL, perfazendo com água.
- Solução hidróxido de sódio (1 M e 10 M). Foram pesados 40 g de hidróxido de sódio e diluídos num balão de 100 mL, perfazendo com água, para obter uma solução 10 M. A solução a 1 M foi obtida dissolvendo 10 mL da solução 10 M, num balão de 100 mL, e perfazendo com água.

#### 3.5.2.2.1. Soluções Padrão

Para o estudo da solubilidade e estabilidade dos nitratos durante a digestão foram preparadas amostras controlo contendo nitratos nas concentrações de 1,2,4,8 e 10  $\mu\text{g/mL}$ . Para simular o processo digestivo após a ingestão de alimento foi utilizada uma refeição padrão representativa de alimento para criança contendo carne (massinhas com frango) à semelhança do que se refere no trabalho desenvolvido em Oomen e colaboradores (2003b) (A. G. Oomen, van Twillert, Hofhuis, Rompelberg, & Versantvoort, 2003) e adaptado em Brandon e colaboradores (Brandon, Baars, te Biesebeek, Blokland, Oomen, Bakker, et al.).



- A solução-mãe padrão de referência foi obtida diluindo 2,0375 g de  $\text{KNO}_3$  em fase móvel, num balão de 25 mL, perfazendo com fase móvel para ter a concentração de 50 mg/mL. Para as soluções padrão de referência diluiu-se 15,2; 30,4; 60,8; 121,60 e 152  $\mu\text{L}$  da solução-mãe padrão de referência no volume total de 38 mL de sucos digestivos (volume total dos sucos) obtendo-se as concentrações de 1, 2, 4, 8 e 10  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. As concentrações dos padrões foram obtidas tendo em conta o volume final de extracção de 200 mL.

### 3.5.3. MATERIAIS

- Erlenmeyers de 500 e 1000 mL
- Barras magnéticas
- Tubos de centrífuga de 85 mL, Nalgene
- Tubos de polipropileno de 10 mL
- Barquinhas de plástico
- Pipetas de vidro
- Micropipeta P1000, Gilson
- Frascos de vidro de 500 mL e 1000 mL
- Dispensores automáticos de 6 mL e 12 mL, Brand.

### 3.5.4. EQUIPAMENTOS

Para a digestão *in vitro* foram usados os seguintes equipamentos:

- Balança analítica Metler Toledo.
- Agitador magnético com placa de aquecimento, Yellow Line.
- Agitador cambalhota, Heidolph.

- Potenciómetro pH 827 pH Lab, Metrohm
- Eléctrodo para medição de pH de substâncias viscosas, Metrohm.
- Estufa, Termaks.
- Centrífuga 5804 R, Eppendorf.

### 3.5.5. PROCEDIMENTOS

Para o estudo da bioacessibilidade foram usadas amostras conservadas a -20°C. As folhas de registo usadas na preparação e leitura de pH dos sucos e na digestão das amostras correspondem aos Anexos III (Bioacessibilidade sucos – III.1 saliva, III.2 suco gástrico, III.3 suco duodenal e III.4 suco biliar), Anexo IV (Bioacessibilidade sucos pH), Anexo V (Digestão nitratos – pesagens) e Anexo VI (Digestão nitratos – pH).

De seguida, descrevem-se os procedimentos usados na preparação dos sucos, digestão de amostras e tratamento de resultados.

#### 3.5.5.1. PREPARAÇÃO DOS SUCOS

A preparação dos sucos digestivos foi efectuada usando água ultrapura. Os sucos foram preparados usando os reagentes de acordo com a composição e quantidades apresentadas na Tabela 7. Os reagentes foram diluídos em 250 mL e 500 mL de água para a preparação de saliva e suco biliar, e para a preparação de suco gástrico e suco duodenal, respectivamente.

TABELA 7. Composição e pH dos sucos de digestão (Brandon, et al.).

	Saliva	Suco Gástrico	Suco duodenal	Suco biliar
Volume final	250 mL	500 mL	500 mL	250 mL
<b>Fase inorgânica</b>	74,5 mg NaCl	1376 mg NaCl	3506 mg NaCl	1315 mg NaCl
	224 mg KCl	412 mg KCl	282 mg KCl	94 mg KCl
	423,5 mg NaHCO <sub>3</sub>	153 mg NH <sub>4</sub> Cl	1694 mg NaHCO <sub>3</sub>	1446 mg NaHCO <sub>3</sub>
	255,25 mg NaH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	153 mg NaH <sub>2</sub> PO <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	25 mg MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	37,5 µL HCl
	142,5 mg Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	200 mg CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	40 mg KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	--
	50 mg KSCN	3,25 mL HCl 37%	--	--
<b>Fase orgânica</b>	50 mg ureia	325 mg glucose	50 mg ureia	63 mg ureia
		10 mg ácido glucorônico		
		42,5 mg ureia		
		165 mg D (+) glucosamina		
<b>Adicionar à mistura de fase inorgânica e orgânica</b>	72,5 mg amilase	500 mg BSA	500 mg BSA	450 mg BSA
	6,3 mg mucina	1500 mg mucina	4500 mg pancreatina	7500 mg bílis
	3,75 mg ácido úrico	1250 mg pepsina	800 mg lipase	55,5 mg CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O
			100 mg CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	
<b>pH</b>	6,5 ± 0,2	1,3 ± 0,1	8,1 ± 0,2	8,2 ± 0,2

Para a preparação dos sucos, foram pesados e diluídos em água, os reagentes da fase inorgânica, fase orgânica e enzimas, mantendo a ordem referida, em agitação contínua. A dissolução da amílase, mucina, albumina, pepsina, pancreatina, lipase e bílis demorou

cerca de 1 hora à temperatura ambiente. O pH de cada suco foi medido após dissolução total de todos os componentes e ajustado conforme necessário com HCl 37 % ou NaOH 10 M para obter o valor de pH pretendido.

De seguida, efectuou-se a leitura dos valores de pH de duas misturas de sucos representativos da fase gástrica e intestinal, de forma a certificar que estavam nas condições pretendidas para os ensaios. Para a fase gástrica, adicionou-se 1 mL de saliva e 2 mL de suco gástrico, num tubo de 10 mL e mediu-se o pH que deveria situar-se a  $2,5 \pm 0,5$ . Para a fase intestinal, adicionou-se 1 mL de saliva, 2 mL de suco gástrico, 2 mL de suco duodenal, 1 mL de bÍlis e 333 µL de solução NaHCO<sub>3</sub> 1M, num tubo de 10 mL e mediu-se o pH que deveria situar-se a  $6,5 \pm 0,5$ . Quando o pH da solução da fase intestinal não se situava dentro dos parâmetros recomendados, os sucos eram preparados novamente.

#### 3.5.5.2. DIGESTÃO DAS AMOSTRAS

A digestão das amostras foi efectuada de acordo com o método descrito por Oomen e colaboradores (2003) (A. G. Oomen, van Twillert, Hofhuis, Rompelberg, & Versantvoort, 2003) com ligeiras adaptações relativas à pesagem dos reagentes dos sucos conforme referido por Brandon e colaboradores (Brandon, et al.).

Para os ensaios de bioacessibilidade, foram pesados aproximadamente 4,5 g de cada amostra de alimentos para crianças para tubos de centrífuga de 85 mL. Os sucos foram colocados em frascos de vidro de volume adequado e adicionados sequencialmente aos tubos de centrífuga de 85 mL com dispensores automáticos da forma que a seguir se refere.

A digestão iniciou-se com a adição de 6 mL de saliva ao tubo de centrífuga. Procedeu-se à incubação durante 5 minutos na estufa a 37 °C em agitação no agitador cambalhota. De seguida, foram adicionados 12 mL de suco gástrico e o pH foi medido e registado. Caso o pH não se situasse entre  $2,5 \pm 0,5$ , o pH seria acertado com NaOH 10M ou 1M ou KCl 37% e o valor foi registado. A mistura foi então colocada a 37°C em agitação durante duas horas. Passadas as 2h, foi novamente medido e registado o pH para

monitorizar a sua variação. Por fim, foram adicionados simultaneamente 12 mL de suco duodenal, 6 mL de bÍlis e 2 mL de solução de bicarbonato ( $\text{NaHCO}_3$ ). O pH desta mistura foi medido e registado e caso não se situasse a  $6,5 \pm 0,5$ , o pH seria acertado com NaOH 10M ou 1M ou KCl 37%. A mistura foi novamente colocada a 37°C em agitação por mais 2 horas. Passadas as 2h o pH foi medido novamente e registado. O quimo resultante foi então centrifugado a 2750 rpm durante 5 minutos. A centrifugação visa separar o sobrenadante do pellet. O sobrenadante foi recolhido para quantificação dos nitratos, de acordo com o método de determinação de nitratos descrito anteriormente.

Todas as amostras foram digeridas e analisadas em duplicado. Foi ainda efectuado um ensaio branco (sem amostra) em duplicado para todas as séries de digestão. Foram também efectuados ensaios controlo para estudar a solubilidade e estabilidade dos nitratos nas concentrações usadas na curva de calibração durante a digestão (1, 2, 4, 6, 8 e 10 µg/mL) referidos na secção 3.6.2.2.1., com e sem refeição padrão representativa.

### 3.5.5.3. TRATAMENTO DOS RESULTADOS

Todas as amostras digeridas e os ensaios de brancos da digestão foram analisadas para quantificação de nitratos nas mesmas condições descritas na determinação de nitratos (secção 3.2.5.). Os cálculos para determinação da bioacessibilidade foram efectuados em folhas de cálculo Excel (Anexo VII).

Aos resultados das amostras foi subtraído o valor de nitratos obtido nos ensaios de branco, de modo a excluir a interferência que o branco teria sobre o valor real.

A seguinte fórmula (Fórmula 8) foi usada para calcular a quantidade de nitratos (µg) no volume total do quimo.

$$N = [((A \times V_{\text{dil}}) / 1) \times (V_{\text{dig}} + m)] / V_{\text{sobren}}$$

**EQUAÇÃO 7.** Equação para determinar a quantidade de nitratos (µg) no volume total de quimo.

Sendo:

$N$  = Quantidade de nitratos no volume total de quimo ( $\mu\text{g}$ )

$A$  = Concentração corrigida com o valor de branco ( $\mu\text{g/mL}$ )

$V_{\text{dil}}$  = Volume em que o sobrenadante (obtido na digestão) foi diluído para determinação de nitratos (mL)

$m$  = Amostra (volume que a amostra ocupa – pressuposto de que a densidade da amostra é 1 logo  $V=m$ )

$V_{\text{dig}}$  = Volume total dos sucos de digestão e volumes adicionados no acerto de pH (mL)

$V_{\text{sobren}}$  = Volume de sobrenadante obtido na digestão utilizado na extração dos nitratos.

Para determinar o valor final da concentração de nitratos (mg/kg) o valor resultado desta equação (quantidade de nitratos no volume total de quimo -  $\mu\text{g}$ ) foi dividido pela massa da toma da amostra (4,5 g), conforme se descreve na equação 9:

$$N_{\text{final}} = N/m$$

**EQUAÇÃO 8.** Equação para determinar a concentração de nitratos após a digestão (mg/kg)

Sendo:

$N_{\text{final}}$  = Concentração de nitratos bioacessível (mg/kg)

$N$  = Quantidade de nitratos no volume total de quimo ( $\mu\text{g}$ )

$m$  = Amostra (g)

A bioacessibilidade é expressa em percentagem em relação aos nitratos iniciais não digeridos, calculada da seguinte fórmula 10:

$$B = (N_{\text{final}}/\text{Nit}) \times 100$$

EQUAÇÃO 9. Equação para determinar a bioacessibilidade em percentagem.

Sendo:

B = Bioacessibilidade (%)

$N_{\text{final}}$  = Concentração após digestão (mg/mL)

Nit = Concentração antes da digestão (mg/mL)

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE NITRATOS

Conforme referido, o método analítico utilizado para a determinação quantitativa de nitratos nas amostras de alimentos infantis, baseado no trabalho de Hunt e Seymour (1985) (Hunt & Seymour, 1985) e na norma EN 12014-2 (EN), encontra-se validado e implementado no Laboratório de Química do Departamento de Alimentação e Nutrição do INSA.

A análise qualitativa dos nitratos, ou seja, a sua identificação foi realizada através da comparação dos tempos de retenção dos picos cromatográficos das amostras com os dos picos dos padrões. A Figura 8 e 9 representam cromatogramas de uma solução padrão e de uma solução amostra, respectivamente.

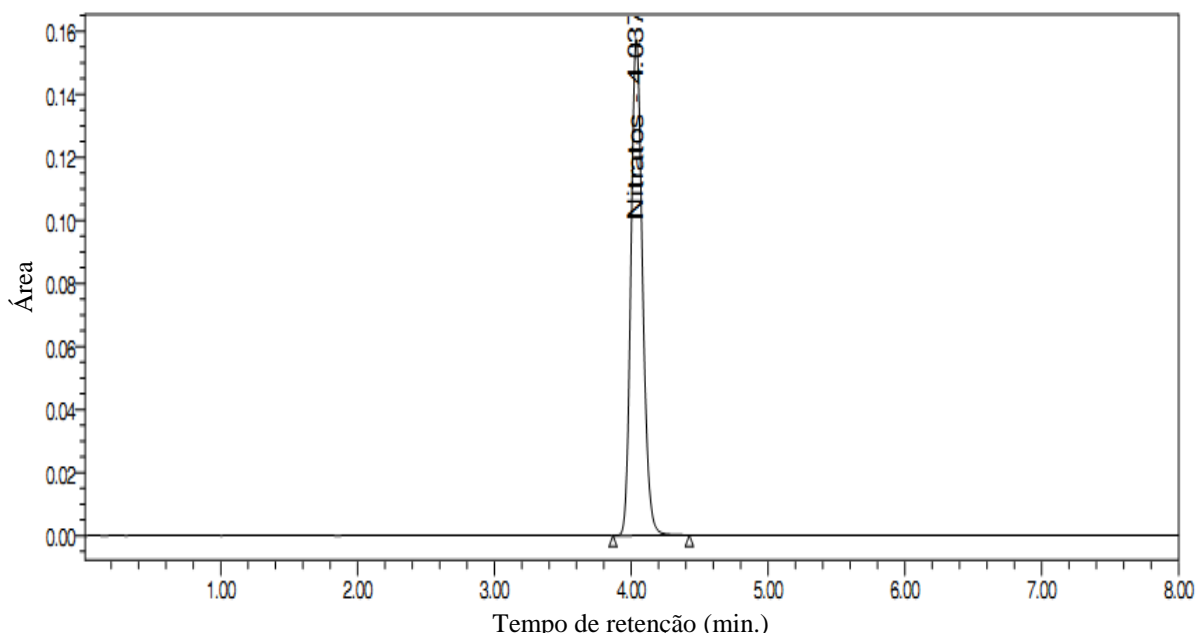


FIGURA 8. Cromatograma de uma solução padrão de controlo de 6 µg/mL.



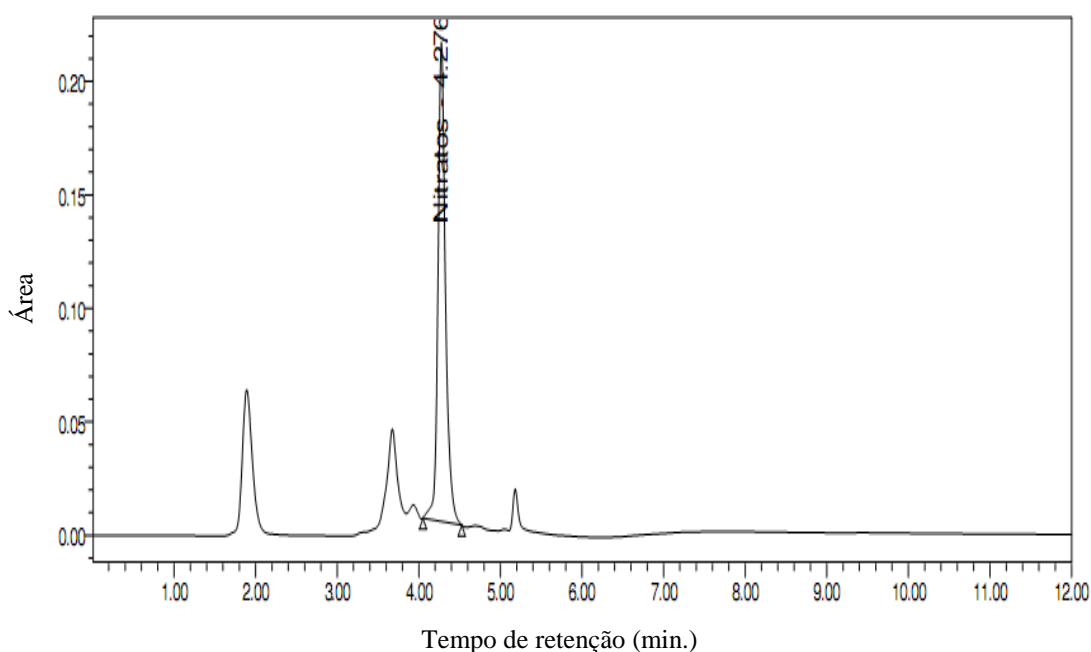


FIGURA 9. Cromatograma de uma solução amostra.

A análise quantitativa foi realizada pelo método do padrão externo, através da comparação da área do pico do analito a ser quantificado na amostra com a área do pico desse mesmo analito em soluções padrão cuja concentração é conhecida. Os cromatogramas de cada uma das soluções padrão foram integrados de forma a construir um gráfico de área de pico em função da concentração (curva de calibração). A equação da curva de calibração foi utilizada na determinação da concentração do analito na amostra, com base na respectiva área do pico no cromatograma da amostra.

As equações das curvas de calibração foram calculadas pelo método dos mínimos quadrados através do *software* “Empower” (Anexo VIII).

A concentração do nitrato na amostra foi calculada interpolando a área do pico da amostra na respectiva curva de calibração, usando o *software* “Empower” (Anexo IX).

A concentração final do nitrato em cada amostra (em mg/kg) foi obtida considerando a toma de amostra e as diluições efectuadas, utilizando folhas de cálculo internas do INSA, cujo exemplar se encontra em anexo (Anexo II).

#### 4.1.1. ESTUDOS DE REPETIBILIDADE E PRECISÃO INTERMÉDIA

Para os estudos de repetibilidade e precisão intermédia foi utilizada uma amostra de alimentos infantis (amostra “legumes e massa”). O Anexo X representa os resultados das análises de nitratos nas amostras das 3 séries realizadas ao longo de 3 dias. A Tabela 8 apresenta os resultados dos estudos de repetibilidade para as 3 séries realizadas ao longo de 3 dias de análise de nitratos e a Tabela 9 os resultados obtidos para a precisão intermédia. O Anexo XI representa a folha de cálculo totalmente preenchida com os dados e resultados relativos à repetibilidade e o Anexo XII representa a folha de cálculo relativos à precisão intermédia.

**TABELA 8.** Resultados dos estudos de repetibilidade em 3 séries de análise (n=6 em cada série).

Nº de ensaios por Operador	6	6	6
Média	32,35	33,20	33,36
Desvio Padrão	0,54	0,92	1,08
Variância	0,29	0,85	1,17
CV%	1,68	2,78	3,25
Desvio padrão da repetibilidade	1,08		
Variância da repetibilidade	1,17		
Limite de repetibilidade (r)	3,03		

**TABELA 9.** Resultados dos estudos de precisão intermédia em 3 séries de análise (n=6 em cada série).

Nº de ensaios por operador	n	6
Média dos ensaios de todos os operadores (N ensaios)	$\bar{y}$	32,97
Numero total de determinações	N	18
	$\sum (y - \bar{y})^2$	15,16
Desvio padrão da precisão intermédia	$S_{pi}$	0,94
Variância da precisão intermédia	$S_{pi}^2$	0,89
Limite de precisão intermédia	$P_i$	<b>2,64</b>
CV%	CV%	2,86

O Regulamento (CE) 1882/2006 (CE, 2006d) fixa critérios específicos no que diz respeito aos valores do desvio padrão relativo calculado a partir de resultados obtidos em condições de repetibilidade ( $RSD_r$ ) e de reprodutibilidade ( $RSD_R$ ) para os métodos de análise utilizados na análise de géneros alimentícios. Desta forma, pode-se verificar na Tabela 10, que os valores obtidos para o  $RSD_r$  e para  $RSD_R$  encontram-se abaixo do valor recomendado pelo Regulamento para este tipo de amostra.

**TABELA 10.** Desvio padrão relativo da repetibilidade e da precisão intermédia obtidos experimentalmente e calculados (Regulamento (CE) 1882/2006) (CE, 2006d)

Matriz	Alimento para criança
Concentração (mg/kg)	33
C	0.000033
RSD <sub>R</sub> o	1,0
RSD <sub>R</sub> r	9
RSD <sub>R</sub> vmax	19
RSD <sub>r</sub> o	0,5
RSD <sub>r</sub> r	6
RSD <sub>r</sub> vmax	12

C - razão de concentração (i.e. 1 = 100 g/100 g, 0.001 = 1 000 mg/kg).

$$RSD_R = 2^{(1-0,5\log C)}$$

$$RSD_r = 0,66 \times RSD_R$$

o - obtido

r - recomendado

vmax - valor máximo

Apesar de o método se encontrar validado e os desvios padrões relativos para a repetibilidade e reprodutibilidade se encontrarem calculados, o estudo aqui realizado vem confirmar a aceitação destes valores obtidos experimentalmente.

#### 4.1.2. OCORRÊNCIA

Neste estudo foram quantificadas a presença de nitratos em 20 amostras de alimentos preparados destinados a lactentes e crianças jovens e a sua identificação encontra-se no Anexo I, incluindo características como a marca, composição, a idade de consumo, origem (produção convencional ou biológica) e o local de aquisição.

Nas Tabelas 11 e 12 estão apresentados os teores de nitratos das amostras analisadas, separadas de acordo com a sua origem convencional e biológica, respectivamente, e os respectivos valores de recuperação. Todas as amostras analisadas apresentaram teores de nitratos inferiores aos limites estabelecidos pelo Regulamento (CE) 1881/2006 (CE, 2006c) para alimentação infantil (200 mg NO<sub>3</sub>/kg), variando entre 24 mg NO<sub>3</sub>/kg (amostra “creme de ervilhas”) e 164 mg NO<sub>3</sub>/kg (amostra “legumes”). Como o teor de nitratos nas amostras estudadas não apresenta uma distribuição Gaussiana para uma probabilidade de 5%, foi calculado um valor mediano de 55 mg NO<sub>3</sub>/kg para o valor da ocorrência de nitratos nos alimentos preparados destinados a lactentes e crianças jovens. Este valor situa-se dentro do intervalo obtido por Vasco e Alvito (2011) de 102 ± 47 mg NO<sub>3</sub>/kg para as 30 amostras deste tipo de alimentos que estudaram.

Os valores de recuperação variaram entre 71% (amostra “legumes e massa”) e 163% (amostra “bechamel com pescada”), apresentando quatro amostras valores acima dos valores permitidos pelo Regulamento (CE) 1882/2006 (CE, 2006d) (60-120%).

No que diz respeito ao tipo de agricultura, a distribuição não gaussiana (Anexo XIII) dos teores de nitratos em amostras de origem convencional permite apresentar um valor mediano de 55 mg NO<sub>3</sub>/kg. Para as amostras ditas biológicas foi obtido um valor médio de 72 ± 38 mg NO<sub>3</sub>/kg pois apresentam uma distribuição normal (p=0,05) (Anexo XIV). Os valores máximos registados neste estudo foram de 164 mg/kg para produtos de origem convencional correspondente ao alimento “legumes”, e de 139 mg/kg para produtos de origem biológica correspondente ao alimento “brócolos e cenoura”. Estes resultados estão também de acordo com os obtidos por Vasco e Alvito (2011) no que diz respeito ao teor de nitratos no grupo de amostras convencionais (96 ± 40 mg NO<sub>3</sub>/kg) e nas biológicas (108 ± 54 mg NO<sub>3</sub>/kg). Da mesma forma é possível verificar que as amostras cuja matéria-prima provém de agricultura biológica apresentam valores superiores de nitratos às que provêm de agricultura convencional.

Os resultados dos teores de nitratos estão de acordo com os estudos efectuados sobre nitratos em alimentação infantil. Vasco e Alvito (2011) (Vasco & Alvito, 2011) verificaram que a maioria das amostras continha teores de nitratos dentro dos valores regulamentados, obtendo somente uma amostra em que o teor de nitratos excedera os 200 NO<sub>3</sub>/kg. Também encontraram valores mais elevados de nitratos correspondentes às amostras que tinham vegetais na sua composição. À semelhança do que se observou por Vasco e Alvito (2011), a amostra contendo brócolos na sua composição apresentou um

teor elevado de nitratos, e como foi observado por Hardisson e colaboradores (1996) (Hardisson, Padron, Frías, & Reguera, 1996) e Tamme e colaboradores (2006) (Tamme, Reinik, Roasto, Juhkam, Tenno, & Kiis, 2006), a amostra que continha cenoura (amostra “cenoura e brócolos”), apresentou teores elevados de nitratos.

**TABELA 11.** Ocorrência de nitratos em alimentos de origem convencional e respectiva percentagem de recuperação.

<b>A – Alimentos de origem convencional</b>	<b>NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (mg/kg)</b>	<b>Recuperação</b>
<b>Legumes</b>	164	96%
<b>Feijão-verde, arroz e solha tropical</b>	62	108%
<b>Juliana de legumes</b>	43	133%
<b>Bechamel com pescada</b>	54	163%
<b>Arroz com frango e cenoura</b>	34	93%
<b>Frango com Legumes</b>	66	-
<b>Legumes Verdes e Borrego</b>	43	102%
<b>Legumes com salmão</b>	97	108%
<b>Creme de ervilhas</b>	24	86%
<b>Feijão-verde e batatas ao vapor com vitela</b>	55	108%
<b>Média</b>	<b>64</b>	<b>111%</b>
<b>Mediana</b>	<b>55</b>	
<b>Máximo</b>	164	
<b>Mínimo</b>	24	

TABELA 12. Ocorrência de nitratos em alimentos de origem biológica e respectiva percentagem de recuperação.

B – Alimentos de origem biológica	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/kg)	Recuperação
<b>Ervilhas e Arroz</b>	41	83%
<b>Espinafres com arroz</b>	115	143%
<b>Brócolos e Cenouras</b>	139	101%
<b>Legumes e pato</b>	100	108%
<b>Legumes e truta</b>	77	122%
<b>Legumes e frango</b>	52	97%
<b>Legumes e bacalhau</b>	45	88%
<b>Sopa legumes verdes</b>	91	97%
<b>Legumes e vitela</b>	28	76%
<b>Legumes e massa</b>	33	71%
<b>Média</b>	<b>72±38</b>	99%
<b>Mediana</b>	<b>65</b>	
<b>Máximo</b>	139	
<b>Mínimo</b>	28	

Os valores das Tabelas 11 e 12 foram usados para avaliar a existência de diferenças significativas entre o teor de nitratos nos produtos de origem diferente. Para comparar médias e verificar se são estatisticamente iguais foram utilizados testes de hipóteses. O teste de hipóteses t existe para médias com variâncias iguais e com variâncias diferentes. Logo, foi inicialmente efectuado um teste F (Fisher) para as amostras de origem biológica e convencional e verificou-se que as variâncias entre as amostras são iguais. Desta forma, um teste t para variâncias iguais foi utilizado e foi determinado que as médias do teor de nitratos não diferem significativamente para um  $p=0.05$  (Anexo XV). Não se verificou uma diferença significativa nos valores médios do teor de nitratos

para as amostras de origem biológica e de origem convencional. Estes resultados estão de acordo com os resultados encontrados no estudo realizado por Vasco e Alvito em 2011 (Vasco & Alvito, 2011) para a comparação dos teores de nitratos em alimentação infantil de origem biológica e convencional.

Lairon (2009) (Lairon, 2009) verificou que os teores de nitratos na maioria dos produtos vegetais de origem biológica são menores que o dos produtos vegetais de origem convencional, embora alguns estudos apresentassem valores mais elevados em cenouras de origem biológica e alfaces de origem convencional (Hoogenboom, et al., 2008). Citak e Sonmez (2010) (Citak & Sonmez, 2010) encontraram teores de nitratos mais baixos em espinafres cultivados com fertilização biológica. No estudo realizado por De Martin e Restani (2003) (De Martin & Restani, 2003), estes autores verificaram que os vegetais de origem biológica continham teores de nitratos mais elevados do que os vegetais cultivados de modo convencional.

#### 4.1.3. ESTUDOS DE ESTABILIDADE

As amostras (n=10) para a determinação da estabilidade de nitratos a 4°C e a -20°C foram analisadas durante um período compreendido entre 1 e 4 semanas, e 1 e 3 meses, respectivamente. Os valores de nitratos obtidos em cada estudo de estabilidade foram comparados com o valor de ocorrência da amostra correspondente, tendo em conta o coeficiente de variação da precisão intermédia do método (8%) para alimentos para criança à base de vegetais. O Anexo XVI apresenta os valores obtidos nas análises de nitratos durante os períodos de armazenamento a 4°C e a -20°C.

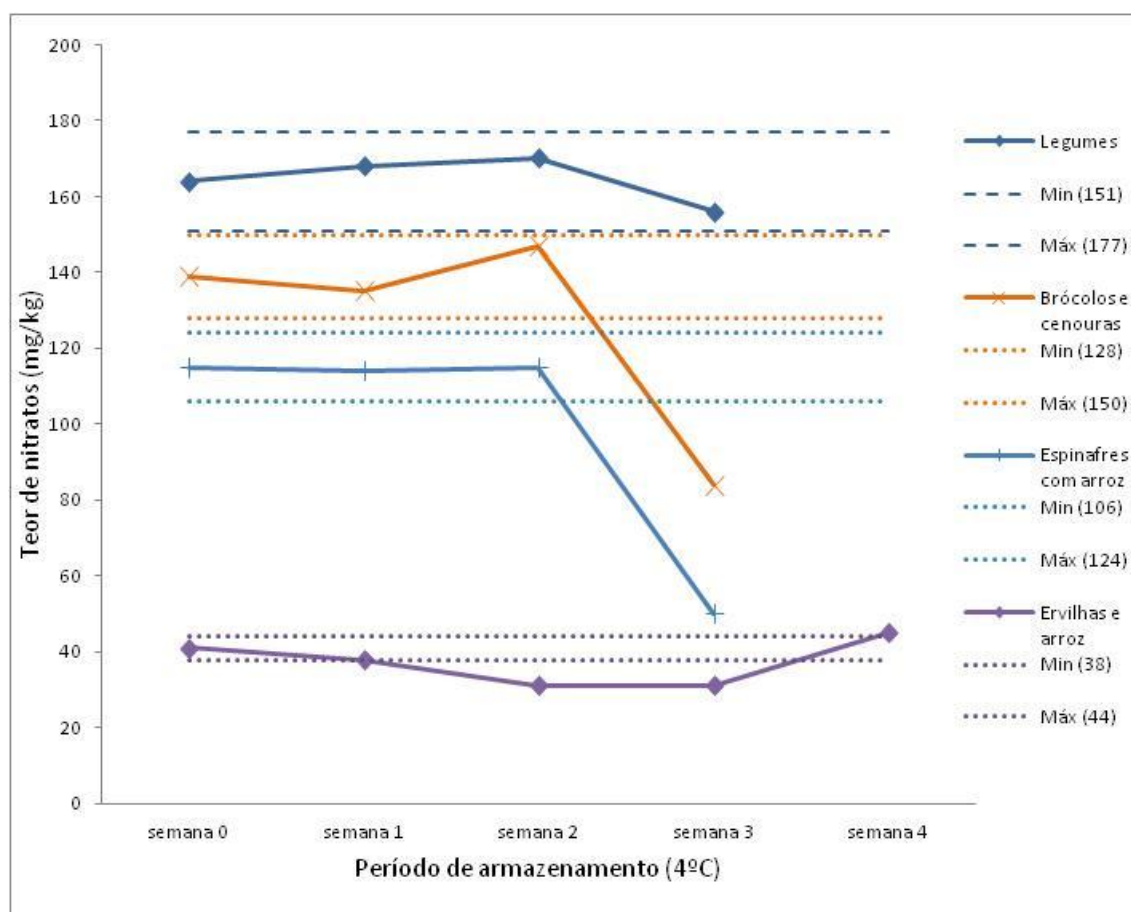
Neste estudo foram formados grupos de amostras: “só legumes”, “carnes” e “peixes” que correspondem aos alimentos preparados para latentes e crianças jovens que incluem só legumes, incluem carne e incluem peixe, respectivamente (Tabela 13).

Os gráficos das Figuras 10, 11 e 12 representam a variação do teor de nitratos ao longo do período de armazenamento de 1 a 4 semanas a 4°C para os 3 grupos de amostras, “só legumes”, “carnes” e “peixes”, respectivamente.



**TABELA 13.** Grupos de amostras formados correspondentes aos alimentos preparados para latentes e crianças jovens.

Grupos	Alimento infantil
<b>Só legumes</b>	Legumes, Brócolos e Cenouras, Espinafres com arroz, Ervilhas e Arroz
<b>Carnes</b>	Legumes Verdes e Borrego, Frango com Legumes, Legumes e vitela
<b>Peixes</b>	Legumes com salmão, Legumes e truta, Legumes e bacalhau



**FIGURA 10.** Variação do teor de nitratos ao longo do período de armazenamento a 4°C das amostras do grupo “só legumes”.

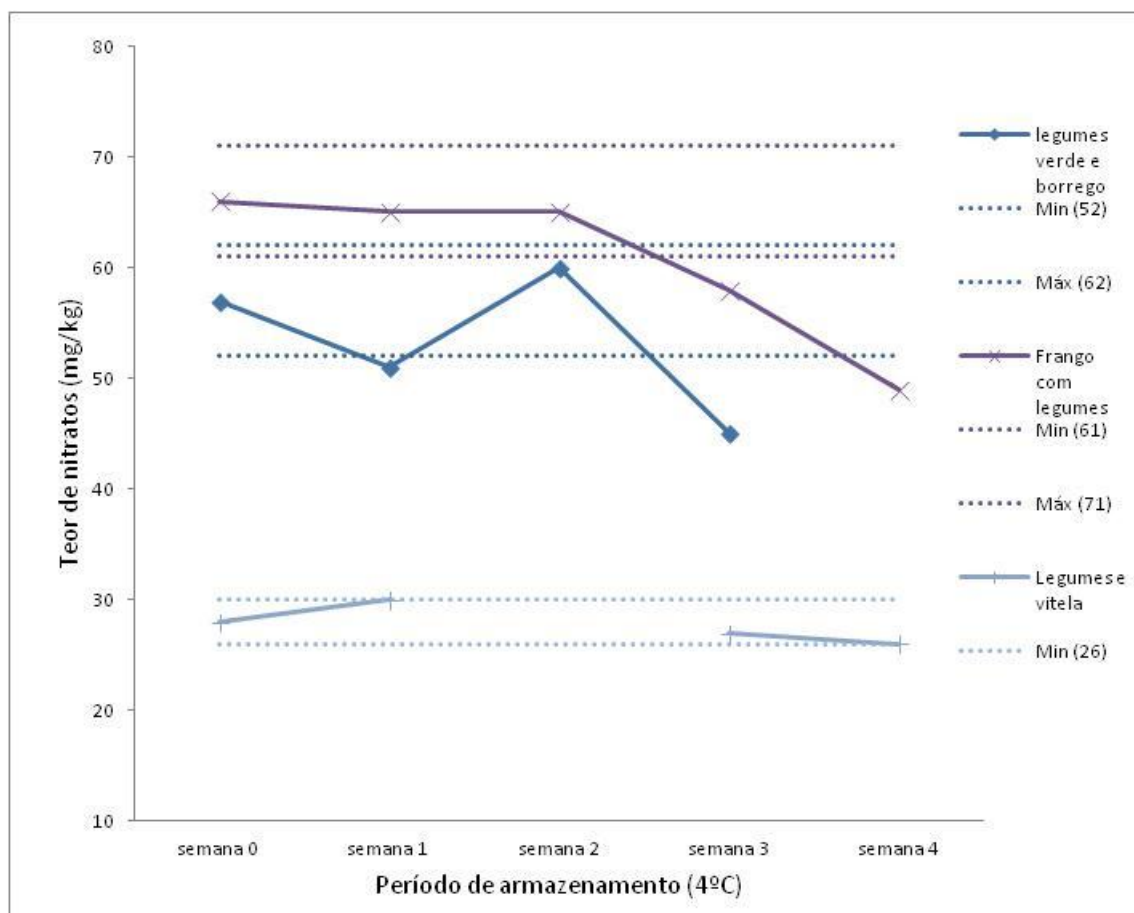


FIGURA 11. Variação do teor de nitratos ao longo do período de armazenamento a 4°C das amostras do grupo “carnes”.

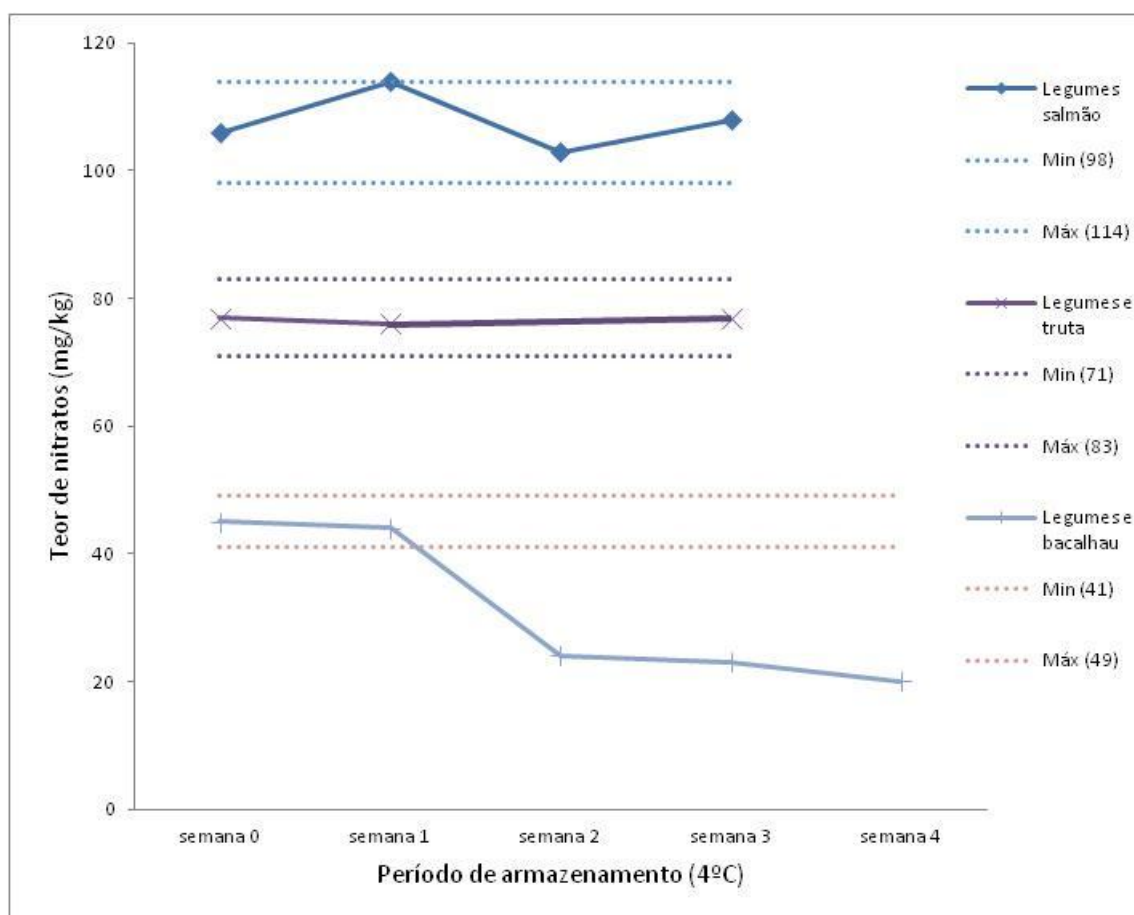


FIGURA 12. Variação do teor de nitratos ao longo do período de armazenamento a 4°C das amostras do grupo “peixes”.

Da análise dos gráficos verifica-se estabilidade do teor de nitratos a 4°C até à segunda semana de armazenamento para os três grupos de amostras com exceção da amostra “legumes e bacalhau” cujo teor diminui logo a partir da primeira semana de armazenamento.

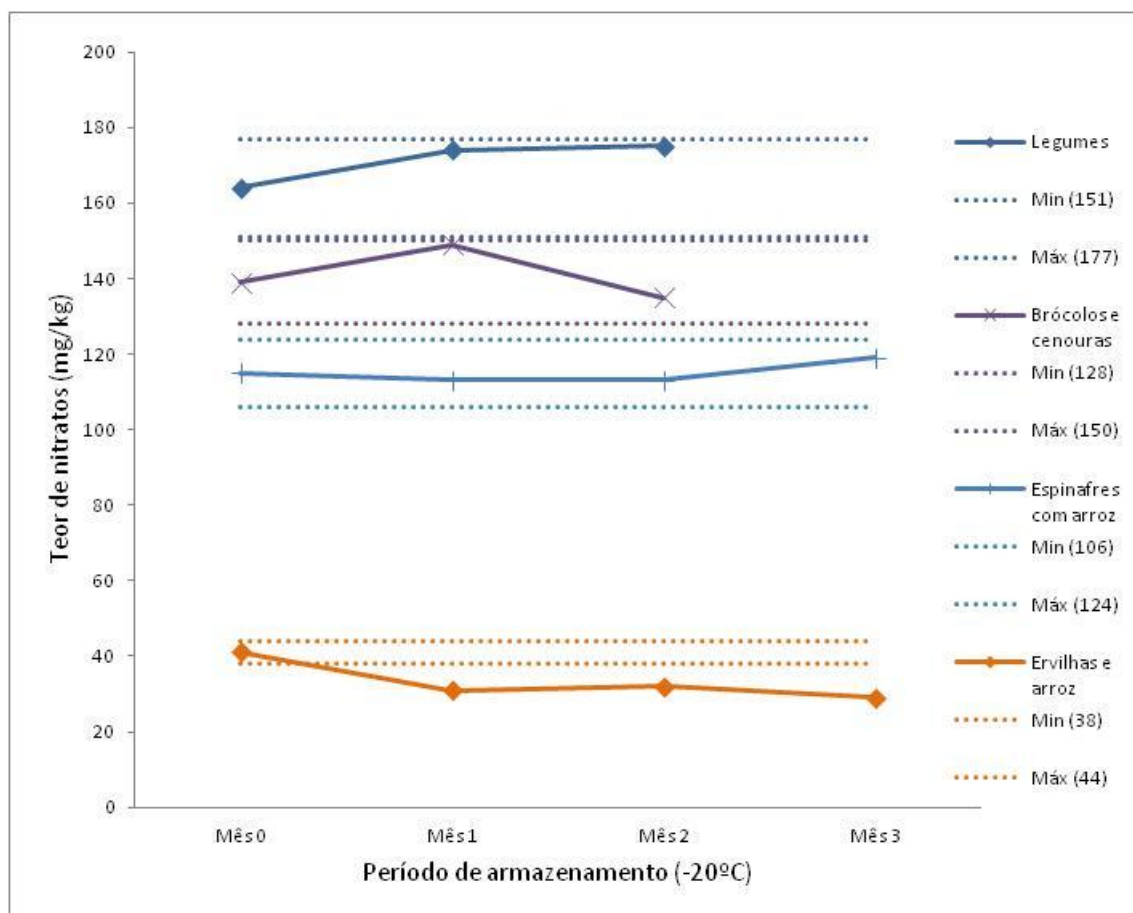


FIGURA 13. Variação do teor de nitratos ao longo do período de armazenamento a -20°C das amostras do grupo dos legumes.

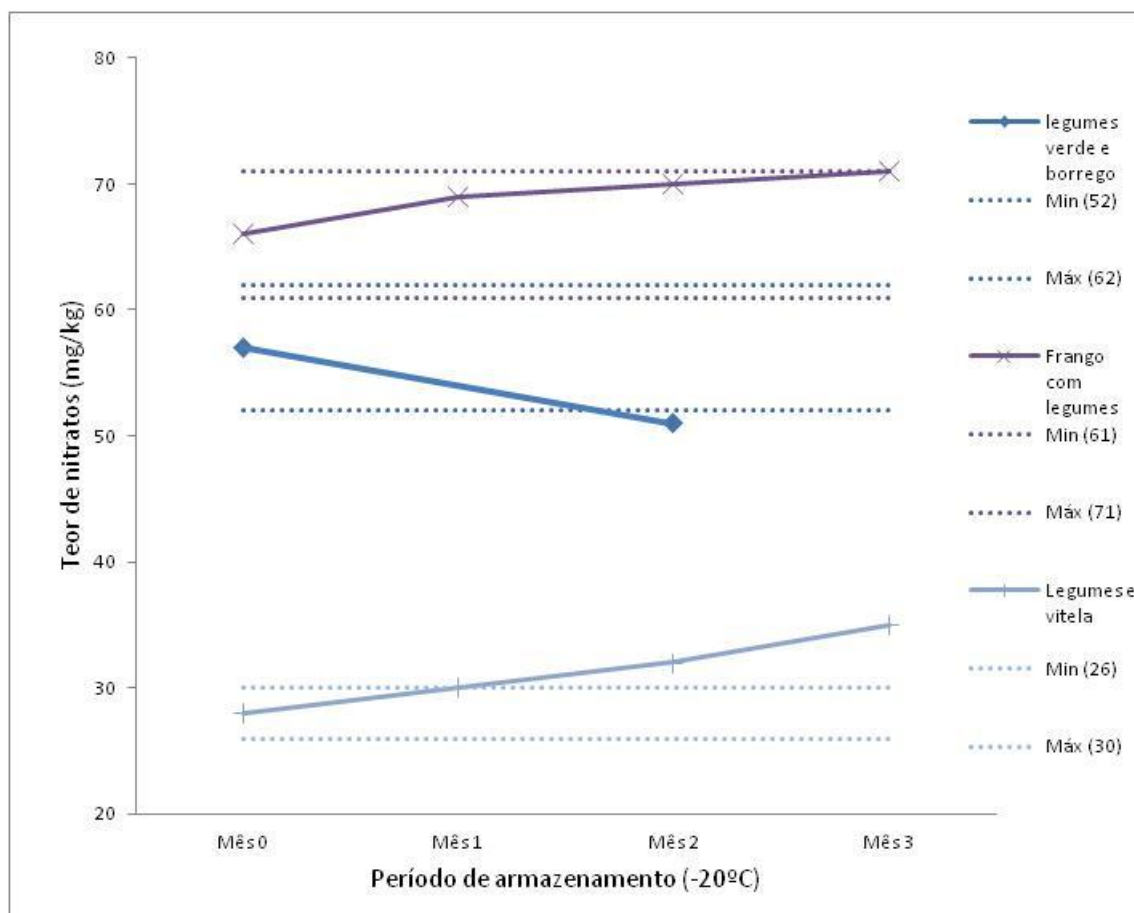


FIGURA 14. Variação do teor de nitratos ao longo do período de armazenamento a -20°C das amostras do grupo das carnes.

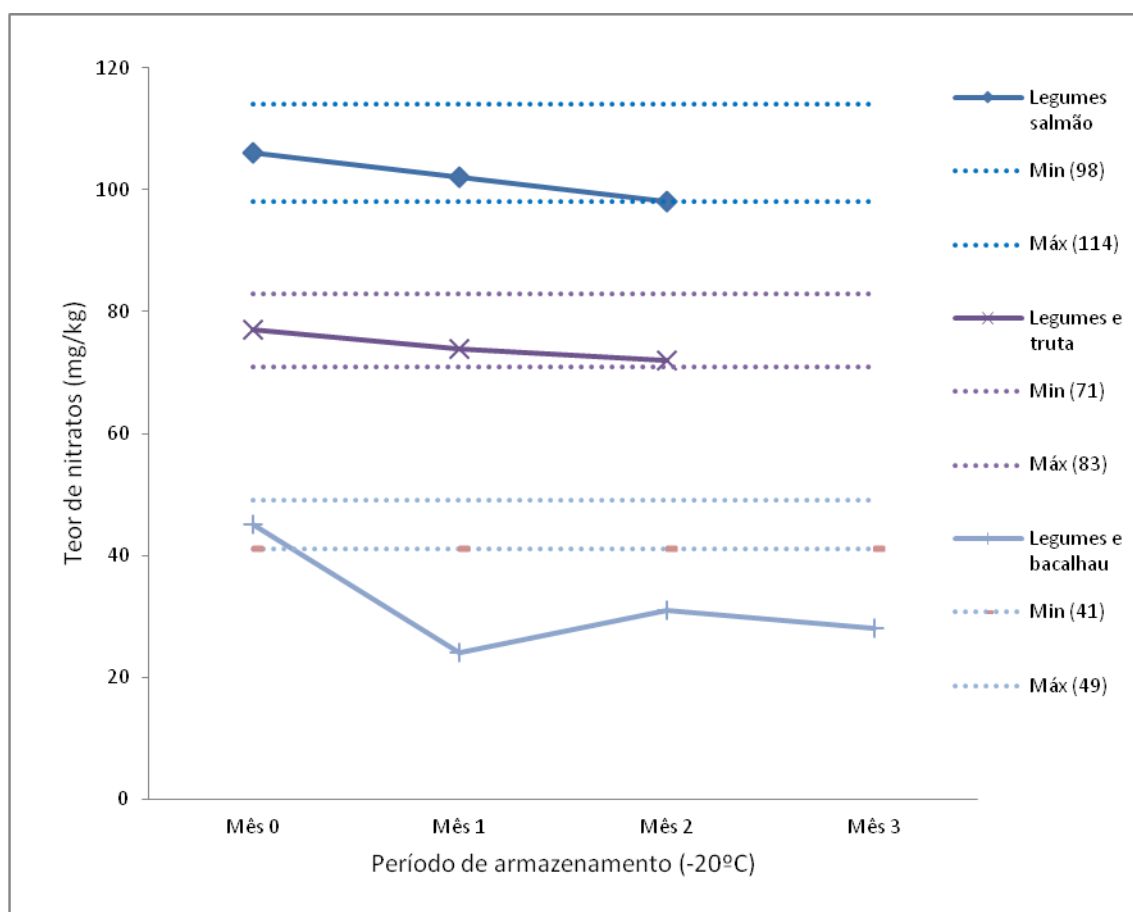


FIGURA 15. Variação do teor de nitratos ao longo do período de armazenamento a -20°C das amostras do grupo das peixes.

Relativamente ao armazenamento a -20°C, os gráficos das Figuras 13, 14 e 15, as amostras revelam estabilidade no teor de nitratos até ao segundo mês de armazenamento para os três grupos de amostras. Apenas as amostras “ervilhas e arroz” e “legumes e bacalhau” apresentaram uma diminuição do teor de nitratos logo no primeiro mês de armazenamento.

O estudo realizado por Chung e colaboradores (2004) (Chung, Chou, & Hwang, 2004) demonstrou que em amostras de espinafre, espinafre chinês e couve chinesa, os nitratos mantiveram-se estáveis durante uma semana de armazenamento a 5 °C e que diminuíram significativamente à temperatura ambiente. Da mesma forma, Tamme e colaboradores (2010) (Tamme, Reinik, Pussa, Roasto, Meremae, & Kiis, 2010) verificaram que os valores de nitratos diminuíram significativamente durante o

armazenamento à temperatura ambiente e que houve pouca variação durante o armazenamento a 4-6°C em amostras de sumos vegetais crus. No presente estudo os teores em nitratos durante a primeira semana de armazenamento a 4° estão, para a maioria das amostras, de acordo com os resultados obtidos por Chung e Tamme, ou seja, mantiveram-se estáveis..

Estes resultados são indicativos que apesar do armazenamento a frio poder retardar a conversão dos nitratos a nitritos, o armazenamento durante várias semanas pode ser considerado tempo excessivo de conservação, mesmo a 4°C, uma vez que houve uma redução significativa no teor de nitratos na maioria das amostras.

O armazenamento a -20°C até dois meses poderá ser considerado adequado para a manutenção do conteúdo em nitratos, mas essa temperatura de armazenamento é pouco provável de ser usada como método de armazenamento corrente.

Mais estudos e um maior e variado número de matrizes deverão ser trabalhadas no que diz respeito à tempo e temperatura de armazenamento.

#### 4.2. BIOACESSIBILIDADE

Neste estudo apresentam-se pela primeira vez as folhas de cálculo desenvolvidas para as várias etapas do modelo de digestão *in vitro*. Os Anexos III a VII apresentam os modelos usados especificamente na preparação dos sucos (Anexo III), medição dos valores de pH (Anexo IV), digestão de nitratos - pesagens (Anexo V), digestão de nitratos- pH (Anexo VI) e bioacessibilidade (anexo VII). De seguida referem-se e discutem-se os resultados obtidos nos estudos de brancos e controlos da digestão e na bioacessibilidade dos nitratos em alimentação infantil.

#### 4.2.1. ENSAIOS BRANCOS E CONTROLOS DE DIGESTÃO

Neste estudo foram incluídos ensaios para determinar a ocorrência de nitratos nos sucos digestivos – ensaios brancos – e estudar a solubilidade e estabilidade dos nitratos durante a digestão com e sem alimento – ensaios controlo da digestão (secção 3.5.5.2.).

A Tabela 14 apresenta os teores de nitratos quantificados nos ensaios brancos incluídos em cada estudo de bioacessibilidade revelando a presença de nitratos com teores compreendidos entre 1,2 e 1,4 µg/mL (n=5, cv=5%). A presença de nitratos nos sucos relaciona-se provavelmente com a composição dos próprios meios (a partir do NH<sub>4</sub>Cl, ou dos enzimas os compõem), e os nitratos seriam formados nos sucos durante o processo de digestão. Estes resultados confirmam a necessidade de incluir ensaios brancos em todos os estudos de bioacessibilidade de nitratos de forma a anular a interferência dos sucos no teor de nitratos final.

TABELA 14. Resultados dos ensaios brancos dos estudos de bioacessibilidade (n=5).

Data de digestão	Nitratos no branco (µg/mL)	Média	SD	CV%
04-07	1,265	1,26	0,07	5,48
19-04	1,371			
18-07	1,185			
27-07	1,243			
02-08	1,232			

Para o estudo da solubilidade e estabilidade dos nitratos durante a digestão foram preparadas tubos de digestão controlo, adicionando soluções padrão de referência de nitratos de modo a obter concentrações de 1, 2, 4, 8 e 10 µg/mL no volume total dos sucos (38 mL). As Tabela 15 e 16 e a Figura 16 apresentam, respectivamente, os resultados relativos à digestão dos padrões de nitratos na ausência de alimento, presença



de alimento (4,5g de amostra), e a curva de calibração obtidas. Em ambos os casos, os valores teóricos de nitratos adicionados aos tubos de digestão e os valores de nitratos determinados após digestão, as curvas de calibração apresentam-se lineares com um coeficiente de determinação superior a 0,995 e declives próximos (0,9145 e 0,8722). Estes resultados indicam que a libertação dos nitratos nos alimentos infantis estudados não é limitada pela sua solubilidade nos sucos digestivos, ou seja, não há saturação do quimo com nitratos para os teores compreendidos entre 1-10 µg/mL pelo que poderá ser usada esta gama de concentrações nos estudos de biacessibilidade.

**TABELA 15.** Estudo da solubilidade e estabilidade de padrões de nitratos na digestão na ausência de alimento (n=4, A-D), DP=desvio padrão, CV=coeficiente de variação

Concentração	A	B	C	D	Média	DP	CV
<b>1</b>	0,926	0,739	0,905	1,353	0,98075	0,261883	26,70236
<b>2</b>	1,893	1,677	1,845	2,123	1,885	0,184	9,764
<b>4</b>	3,044	3,529	3,457	3,889	3,480	0,347	9,959
<b>8</b>	7,765	7,619	7,311	7,492	7,547	0,193	2,554
<b>10</b>	9,532	8,805	8,717	9,175	9,057	0,374	4,124

**TABELA 16.** Estudo da solubilidade e estabilidade de padrões de nitratos na digestão na presença de alimento (n=3, A-C), DP=desvio padrão, CV=coeficiente de variação

Concentração	A	B	Média	DP	CV
<b>1</b>	0,458	0,812	0,707	0,217	30,625
<b>2</b>	1,343	1,47	1,407	0,090	6,385
<b>4</b>	3,257	3,252	3,255	0,004	0,109
<b>8</b>	6,194	6,82	6,507	0,443	6,803
<b>10</b>	8,332	8,797	8,598	0,239	2,786

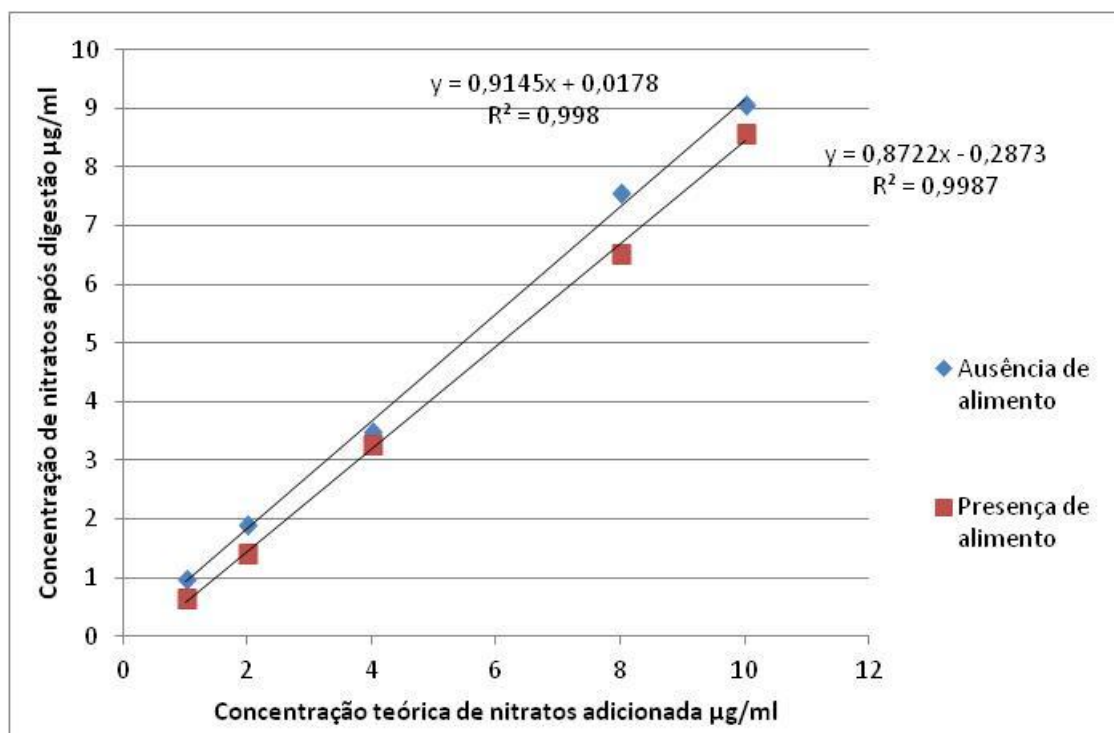


FIGURA 16. Curvas de calibração relativos À digestão dos padrões de nitratos na ausência e na presença de alimento.

Os mesmos resultados foram obtidos por Brandon e colaboradores (Brandon, et al.) relativamente aos estudos de bioacessibilidade da patulina (micotoxina) verificando-se também linearidade para a curva de calibração controlo com alimento.

#### 4.2.2. BIOACESSIBILIDADE DE NITRATOS

A Tabela 17 e Figura 17 apresentam os resultados de bioacessibilidade de nitratos em alimentos infantis com valores variando entre 42% a 159%, obtidos nas amostras de “legumes e truta” e “arroz com frango e cenoura”, respectivamente. Se considerarmos o valor do desvio padrão (obtido tendo em conta o CV da precisão do método de 8%), os valores de bioacessibilidade máximos e mínimos situam-se entre 152-178% e 38-45%, respectivamente. A tabela 17 apresenta uma comparação dos teores de nitratos obtidos antes (estudos de ocorrência) e após digestão *in vitro* e respectivos máximos e mínimos.

A Figura 17 mostra a representação gráfica dos valores de bioacessibilidade obtidos para as 17 amostras de alimentação infantil analisadas colocados por ordem crescente das percentagens de bioacessibilidade tal como na Tabela 16.

TABELA 17. Comparação dos teores de nitratos obtidos antes e após digestão *in vitro* e valores de bioacessibilidade (%) em alimentação infantil (n=17).

Amostra	Nitratos antes da digestão (mg/kg)	Max (mg/kg)	Min (mg/kg)	Nitratos após digestão (mg/kg)	Max (mg/kg)	Min (mg/kg)	Bioacessibilidade (%)	% max.	% min
Legumes e truta	77	83	71	32	35	29	42	45	38
Legumes e bacalhau	45	49	41	20	22	18	44	48	41
Legumes com salmão	106	114	98	50	54	46	47	51	43
Ervilhas e Arroz	41	44	38	22	24	20	54	58	49
Sopa legumes verdes	91	98	84	50	54	46	55	59	51
Brócolos e Cenouras	139	150	128	94	102	86	68	73	62
Legumes	164	177	151	131	141	121	80	86	73
Béchamel com pescada	54	58	50	47	51	43	87	94	80
Espinafres com arroz	115	124	106	101	109	93	88	95	81
Creme de ervilhas	24	26	22	22	24	20	92	99	84
Frango com Legumes	66	71	61	62	67	57	94	101	86
Legumes e frango	52	56	48	49	53	45	94	102	87
Legumes e pato	59	64	54	58	63	53	98	106	90
Legumes e vitela	28	30	26	30	32	28	107	116	99
Legumes Verdes e Borrego	57	62	52	65	70	60	114	123	105
Feijão-verde, arroz e solha tropical	62	67	57	86	93	79	139	150	128
Arroz com frango e cenoura	34	37	31	54	58	50	159	178	152

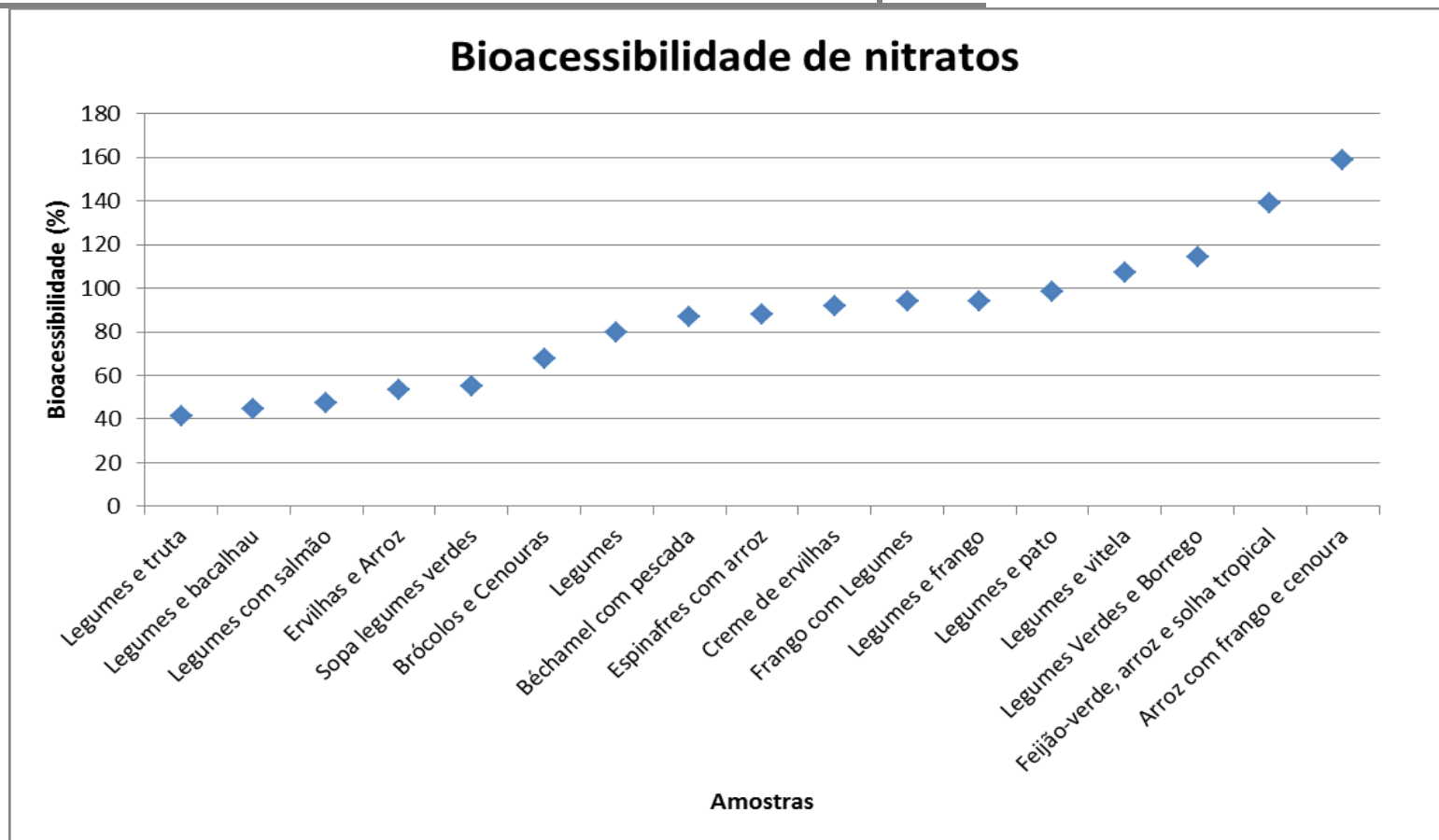


FIGURA 17. Representação gráfica da bioacessibilidade (%) de nitratos em alimentação infantil (n=17) pelo modelo de digestão *in vitro*.

O presente estudo é o primeiro efectuado para a determinação da bioacessibilidade de nitratos em alimentação infantil obtendo-se valores de bioacessibilidade entre 42 e 159%. De forma a tentar organizar os dados e entender esta variabilidade poder-se-á considerar diferentes níveis de bioacessibilidade. Considerando uma variação de 20% para 100% de bioacessibilidade, valores no intervalo de 80-120% são aceites como ocorrendo em matrizes alimentares. Neste caso, 9 amostras encontram-se dentro deste intervalo, 6 abaixo (42-68%) e 2 acima (139-165%). Os valores mais baixos que 80% poder-se-ão atribuir ao facto de o nitrato não estar bioacessível na sua totalidade na matriz ou a matriz ter sofrido alterações na sua composição. O armazenamento a -20°C (já que as amostras usadas neste estudos foram armazenadas algum tempo a esta temperatura até serem analisadas) pode eventualmente levar à degradação do nitrato estando estes já antes da digestão com valores mais baixos. Quando observados os valores de estabilidade das amostras a -20°C e a evolução do teor de nitratos ao longo do tempo de armazenamento verificou-se que algumas amostras apresentaram-se estáveis ao longo desse período e outras não (Figuras 13, 14 e 15), pelo que esta poderá não ser a razão exclusiva da variabilidade encontrada. Algumas amostras apresentaram-se estáveis a -20°C e no entanto a percentagem de bioacessibilidade foi baixa (por exemplo “legumes e truta” e “legumes e bacalhau). Os valores de bioacessibilidade mais elevados poderão ser atribuídos a uma extracção mais eficiente promovida pela presença dos sucos digestivos em interacção com as matrizes analisadas.

Outra tentativa de explicar a variabilidade da bioacessibilidade dos nitratos relaciona-se com a eventual interacção com a diferente composição das matrizes. Neste sentido foi efectuado uma análise dos resultados tendo em conta diferentes grupos de alimentos contendo peixe, só legumes e carne. A Figura 18 refere a representação gráfica das bioacessibilidades dos três grupos de alimentos infantis podendo-se observar que as amostras com peixe apresentam os menores valores de bioacessibilidade (42-47%, com excepção de 2 amostras superiores) e as que contêm carne, os maiores valores de bioacessibilidade (94-165%). Os legumes apresentam valores de bioacessibilidade intermédia (54-92%). Os resultados significam que uma parte substancial dos nitratos é libertada da matriz alimentar contendo carne sendo esta libertação mais reduzida nas amostras com peixe. Estes resultados revelam que, provavelmente, a grande variabilidade da bioacessibilidade dos nitratos em alimentação infantil encontrada poderá ser atribuída à diferença na composição das matrizes. Futuramente deverão ser analisadas mais amostras da mesma matriz (diferentes lotes da mesma amostra) e

efectuar mais réplicas (3 ou 6) da mesma amostra (e não só duplicados) com vista a estimar a variabilidade na bioacessibilidade dos nitratos em alimentação infantil.

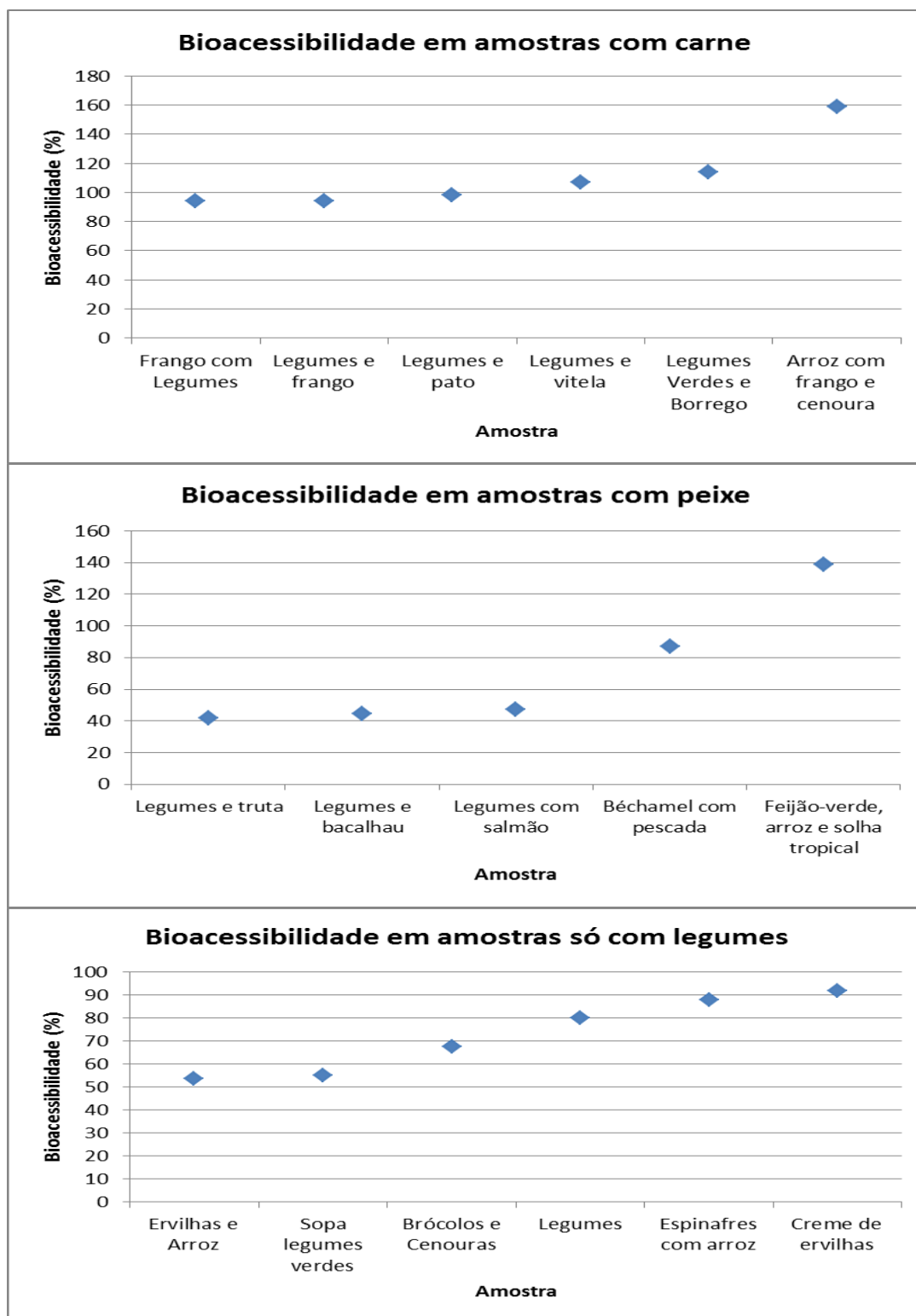


FIGURA 18. Gráficos relativos aos valores de bioacessibilidade dos alimentos de acordo com o grupo “carne”, “peixe” ou “só legumes”.

Os valores de bioacessibilidade encontrados por outros autores em matrizes diferentes são variáveis. Versantvoort e colaboradores (2005) (Versantvoort, Oomen, Van de Kamp, Rompelberg, & Sips, 2005) encontraram valores de bioacessibilidade média para as aflatoxinas e ocratoxina A (OTA), duas micotoxinas, em pasta de amendoim e trigo-sarraceno de 94% e 100%, respectivamente. Kabak e colaboradores (2009) (Kabak, Brandon, Var, Blokland, & Sips, 2009) encontraram valores de 90% e 30% para AFB<sub>1</sub> e OTA em nozes pistachio e trigo-sarraceno, respectivamente. Meca e colaboradores (2011) (Meca, Mañes, Font, & Ruiz, 2011) estudaram a digestão *in vitro* de eniatinas obtendo uma bioacessibilidade média de 80%. A bioacessibilidade do cádmio nas alfaces situou-se entre 49% e 63%, e no rabanete entre 63% e 74% (Versantvoort, van de Kamp, & Rompelberg, 2004). O estudo efectuado por van Velzen (2008) (van Velzen, Sips, Schothorst, Lambers, & Meulenbelt, 2008) sobre a biodisponibilidade *in vivo* de nitratos após consumo de alguns vegetais mostrou que a biodisponibilidade dos nitratos se situava a aproximadamente 100%.

Versantvoort e colaboradores (2005) (Versantvoort, Oomen, Van de Kamp, Rompelberg, & Sips, 2005) verificaram que a bioacessibilidade não é afectada pelo nível de contaminação com aflatoxina B<sub>1</sub> e ocratoxina A na amostra. Os resultados do presente estudo mostram que não existe uma relação entre o teor de nitratos nas amostras antes da digestão e a sua libertação o quimo, o que significa que a quantidade de nitratos nas amostras não está a influenciar a bioacessibilidade deste contaminante. Kabak e colaboradores (2009) (Kabak, Brandon, Var, Blokland, & Sips, 2009) referem como possíveis interferentes na bioacessibilidade, o tipo de matriz alimentar, a natureza do contaminante estudado e a concentração do contaminante. A diferença na composição da matriz (que pode afectar a solubilidade do composto) e outros factores interferentes (proteínas, ácidos gordos) foi indicada por estes autores como responsáveis pelas grandes variabilidades registadas entre as micotoxinas AFB<sub>1</sub> e OTA. Estes autores detectaram também diferenças na bioacessibilidade em amostras contaminadas artificialmente (fortificação) e naturalmente. Neste caso, as toxinas estariam mais ligadas nas amostras contaminadas naturalmente e a sua bioacessibilidade foi inferior às amostras fortificadas. O mesmo resultado foi atribuído por Brandon e colaboradores (Brandon, et al.) para as amostras de patulina contaminadas artificial e naturalmente.



## 5. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

A exposição humana aos nitratos é essencialmente exógena através do consumo de produtos hortícolas. Os alimentos destinados a lactentes e crianças jovens são uma parte importante no desenvolvimento da criança como alimento de transição. A toxicidade dos nitratos resulta da sua conversão a nitritos, que podem levar à formação de metahemoglobinas, principalmente nas crianças, e de compostos cancerígenos N-nitrosos.

O método analítico de HPLC-UV usado na determinação analítica de nitratos em alimentação infantil confirmou ser adequado para o estudo destes produtos tendo sido verificado valores de repetibilidade e precisão intermédia inferiores aos legislados.

Este método foi usado para estudar 20 amostras de alimentos para lactentes e crianças jovens, rotulados como obtidos por agricultura biológica e convencional, e tendo na sua composição peixe, legumes e carne. Os valores obtidos neste estudo situaram-se abaixo dos valores legislados ( $200 \text{ mgNO}_3^-/\text{kg}$ ) situando-se entre os 24 e 164 mg/kg, com uma mediana de 55 mg/kg e recuperação entre 71-163%. As amostras de origem convencional e biológica apresentaram um valor mediano de 55 mg/kg (max 164 mg/kg) e um valor médio de 72 mg/kg (max 139 mg/kg), respectivamente. Não foram registadas diferenças significativas entre os teores de nitratos obtidos para produtos de origem convencional e biológica. Os estudos de estabilidade de nitratos de 11 destas amostras revelaram uma diminuição geral de teores para amostras armazenadas a 4°C a partir da 2ª semana com excepção de uma amostra, e durante o armazenamento -20°C, revelaram estabilidade até ao 2º meses de ensaio, com excepção de duas amostras.

Neste estudo foram apresentados os primeiros resultados sobre a bioacessibilidade de nitratos em alimentação infantil através da aplicação de um modelo de digestão *in vitro* não se conhecendo até ao momento estudos similares. Foram desenvolvidas e apresentadas pela primeira vez as folhas de cálculo usadas para o efeito. Os resultados obtidos mostraram que a libertação de nitratos não foi afectada pela solubilidade dos nitratos nos sucos digestivos o que garante que os valores de bioacessibilidade obtidos foram atribuídos aos efeitos da digestão e não a interferências da solubilidade dos nitratos. Os estudos registaram valores de bioacessibilidade compreendidos entre 42-157%. Esta grande variabilidade foi atribuída à composição da matriz que influencia a bioacessibilidade, tal como referido por outros autores.

Quando analisados os resultados por diferentes grupos de alimentos, registaram-se valores de bioacessibilidade entre 42-47% para as amostras do grupo contendo peixe, 54-92% para só legumes e 94-165% para carnes.

Futuramente deverão ser analisadas mais amostras da mesma matriz (diferentes lotes da mesma amostra) e efectuar mais réplicas (3 ou 6) da mesma amostra (e não só duplicados) com vista a estimar a variabilidade na bioacessibilidade dos nitratos em alimentação infantil.

Os modelos de digestão *in vitro* com base na fisiologia humana foram desenvolvidos como uma forma simples, rápida e relativamente barata para prever uma exposição interna mais realista a um contaminante após a exposição oral a um produto, uma vez que a dose interna que vai provocar os efeitos adversos pode não ser a mesma que é ingerida. Assim, uma melhor compreensão sobre a exposição interna a contaminantes presentes em alimentos levará a uma avaliação mais precisa do risco que um contaminante pode apresentar perante uma situação específica.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- AGROBIO. (2011). Desenvolvimento da AB In): Associação Portuguesa de Agricultura Biológica. Consultado a 15-10-2011: <http://www.agrobio.pt/pt/agricultura-biologica/desenvolvimento-da-ab.html>.
- Alvito, P., Martins, C., Vasco, E., Santiago, S., Furtado, R., Oliveira, F., & Calhau, M. A. (2010). Chemical and microbiological contaminants in baby foods available in the Portuguese market. *2<sup>nd</sup> MoniQA International Conference*.
- Alvito, P., Oliveira, L., Alcobia, D., Capucho, S., Fonseca, C., Vasconcelos, L., & Calhau, M. A. (2004). A comparative study on organic and conventional farming in Portugal - results on contaminant levels in vegetables. *Revista de Alimentação Humana*, 10(1), 27-32.
- Alvito, P., Sizoo, E. A., Almeida, C. M. M., & Van Egmond, H. P. (2010). Occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods in Portugal. *Food Analytical Methods*, 3(1), 22-30.
- Ayaz, A., Topçu, A., & Yurttagul, M. (2007). Survey of nitrate and nitrite levels of fresh vegetables in Turkey. *Journal of Food Technology*, 5(2), 177-179.
- Barreira, M. J., Alvito, P. C., & Almeida, C. M. M. (2010). Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chemistry*, 121, 653-658.
- Brandon, E. F., Baars, A. J., te Biesebeek, J. D., Blokland, M. H., Oomen, A. G., Bakker, M. I., & de Heer, C. Risk assessment of patulin intake from apple containing products by young children.
- Brandon, E. F., Oomen, A. G., Rempelberg, C. J., Versantvoort, C. H., van Engelen, J. G., & Sips, A. J. (2006). Consumer product in vitro digestion model: Bioaccessibility of contaminants and its application in risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 44(2), 161-171.
- Cascade. Health risk assessment of chemical contaminants in food. In): Chemical as Contaminants in the Food Chain. Consultado a 20-10-2011: <http://www.cascadenet.org/projectweb/portalproject/Risk%20Assessment%20Methods.html>.
- CE. (2006a). Directiva 2006/125/CE da comissão de 5 de Dezembro de 2006 relativa aos alimentos à base de cereais e aos alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens. *Jornal Oficial da União Europeia*, L 339, 16-35.
- CE. (2006b). Directiva 2006/141/CE da comissão de 22 de Dezembro de 2006 relativa às fórmulas para lactentes e fórmulas de transição e que altera a Directiva 1999/21/CE. *Jornal Oficial da União Europeia*, L401, 1-33.
- CE. (2006c). Regulamento (CE) N° 1881/2006 da comissão de 19 de Dezembro de 2006 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L364, 5-24.

- CE. (2006d). Regulamento (CE) N° 1882/2006 da comissão de 19 de Dezembro de 2006 que estabelece métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de nitratos em determinados géneros alimentícios. *Jornal Oficial da União Europeia*, L364, 25-31.
- CE. (2007). Regulamento (CE) N° 834/2007 do conselho de 28 de Junho de 2007 relativo à produção biológica e à rotulagem dos produtos biológicos e que revoga o Regulamento (CEE) n. o 2092/91. *Jornal Oficial da União Europeia*, L189, 1-23.
- Chan, T. Y. (2011). Vegetable-borne nitrate and nitrite and the risk of methaemoglobinaemia. *Toxicology Letters*, 200(1-2), 107-108.
- Chou, S., Chung, J., & Hwang, D. (2003). A High Performance Liquid Chromatography Method for Determining Nitrate and Nitrite Levels in Vegetables. *Journal of Food and Drug Analysis*, 11(3), 233-238.
- Chung, J. C., Chou, S. S., & Hwang, D. F. (2004). Changes in nitrate and nitrite content of four vegetables during storage at refrigerated and ambient temperatures. *Food Additives and Contaminants*, 21(4), 317-322.
- Citak, S., & Sonmez, S. (2010). Effects of conventional and organic fertilization on spinach (*Spinacea oleracea* L.) growth, yield, vitamin C and nitrate concentration during two successive seasons. *Scientia Horticulturae*, 126(4), 415-420.
- Cristóvão, A., Koehnen, T., & Strecht, A. (2001). Produção agrícola biológica (orgânica) em Portugal: evolução, paradoxos e desafios. *Agroecologia e Desenvolvimento Rural Sustentável*, 2(4), 37-47.
- Davin, L., Van Egroo, L. D., & Galesne, N. (2010a). Manufactured baby food: safety expectations. *Arch Pediatr*, 17 Suppl 5, S220-224.
- Davin, L., Van Egroo, L. D., & Galesne, N. (2010b). Manufactured baby food: safety expectations. *Arch Pediatr*, 17 (5), 220-224.
- De Martin, S., & Restani, P. (2003). Determination of nitrates by a novel ion chromatographic method: occurrence in leafy vegetables (organic and conventional) and exposure assessment for Italian consumers. *Food Additives and Contaminants*, 20(9), 787-792.
- Decreto-Lei N° 363/98. *Diário da República*, N° 268 - 19-11-1998(I Série-A), pag. .
- Dewey, K. (2003). Guiding principles for complementary feeding of the breastfed child. *PAHO/WHO*.
- Di, H. J., & Cameron, K. C. (2002). Nitrate leaching in temperate agroecosystems: sources, factors and mitigating strategies. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 46, 237-256.
- Du, S., Zhang, Y., & Lin, X. (2007). Accumulation of Nitrate in Vegetables and Its Possible Implications to Human Health. *Agricultural Sciences in China*, 6(10), 1246-1255.

- Dwivedi, U. N., Mishra, S., Singh, P., & tripathi, R. D. (2007). Nitrate Pollution and its Remediation In S. N. Singh & R. D. Tripathi (Eds.), *Environmental bioremediation technologies* (pp. 353-389): Springer.
- EC. (1992). European Commission. Opinion on nitrate and nitrite. *Reports of the Scientific Committee for Food (SCF), 26th Series*, 21-28.
- EC. (1997). European Commission. Opinion on nitrate and nitrite. *Reports of the Scientific Committee for Food (SCF), 38th Series*, 1-33.
- EFSA. (2008). Nitrate in vegetables - Scientific Opinion of the Panel on Contaminants in the Food chain. *The EFSA Journal*, 689, 1-79.
- EN. 12014-2 Foodstuffs – Determination of nitrate and/or content – Part 2: HPLC/IC method for the determination of nitrate content of vegetables and vegetables products.
- FAO/WHO. (2003). Food and Agriculture Organisation of the United Nations / World Health Organization) Nitrate (and potential endogenous formation of N -nitroso compounds. *WHO Food Additive, series 50*(Geneva: World Health Organisation.).
- Fernández-García, E., Carvajal-Lérida, I., & Pérez-Gálvez, A. (2009). In vitro bioaccessibility assessment as a prediction tool of nutritional efficiency. *Nutrition Research*, 29, 751-760
- Geng, Y. J. (2011). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in traditional herbal medicine for heart disease. In N. S. Bryan & J. Loscalzo (Eds.), *Nitrite and Nitrate in Human Health and Disease*, (pp. 247-262). New York: Humana Press.
- Gilchrist, M., & Benjamin, N. (2011). From atmospheric nitrogen to bioactive nitrogen oxides. In N. S. Bryan & J. Loscalzo (Eds.), *Nitrite and nitrate in human health and disease*, (pp. 9-20). New York: Humana Press.
- Gilchrist, M., Winyard, P. G., & Benjamin, N. (2010). Dietary nitrate – Good or bad? *Nitric Oxide*, 22, 104-109.
- Greer, F. R., & Shannon, M. (2005). Infant methemoglobinemia: the role of dietary nitrate in food and water. *Pediatrics*, 116(3), 784-786.
- Hambridge, T. (2003). Nitrate and nitrite: intake assessment. In *WHO Food Additives Series 50* ): WHO Food Additives Series 50. Consultado a 24-10-2011: <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v50je07.htm>.
- Hardisson, A., Padron, A. G., Frías, I., & Reguera, J. I. (1996). The Evaluation of the Content of Nitrates and Nitrites in Food Products for Infants *Journal of Food Composition and Analysis*, 9(3), 13-17.
- Hoogenboom, L. A. P., Bokhorst, J. G., Northolt, M. D., Van De Vijver, L., Broex, N. J. G., Mevius, D. J., Meijs, J. A. C., & Van Der Roest, J. (2008). Contaminants and micro-organisms in

- Dutch organic food products; Comparison with conventional products. *Food Additives and Contaminants*, 25(10), 1195-1207.
- Hunault, C. C., van Velzen, A. G., Sips, A. J., Schothorst, R. C., & Meulenbelt, J. (2009). Bioavailability of sodium nitrite from an aqueous solution in healthy adults. *Toxicology Letters*, 190(1), 48-53.
- Hunt, J., & Seymour, D. J. (1985). Method for measuring Nitrate-nitrogen in vegetables using anion-exchange high-performance liquid chromatographic. *Analyst*, 110, 131-133.
- Kabak, B., Brandon, E. F., Var, I., Blokland, M. H., & Sips, A. J. (2009). Effects of probiotic bacteria on the bioaccessibility of aflatoxin B1 and ochratoxin A using an in vitro digestion model under fed conditions. *Journal of Environmental Science and Health Part B*, 44, 472-480.
- Lairon, D. (2009). Nutritional quality and safety of organic food. A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 30(1), 33-41.
- Lundberg, J. O., Feelisch, M., Bjorne, H., Jansson, E. A., & Weitzberg, E. (2006). Cardioprotective effects of vegetables: is nitrate the answer? *Nitric Oxide*, 15(4), 359-362.
- Lundberg, J. O., Weitzberg, E., & Gladwin, M. T. (2008). The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. *Nature*, 7, 156-167.
- Malmauret, L., Parent-Massin, D., Hardy, J.-L., & Verger, P. (2002). Contaminants in organic and conventional foodstuffs in France. *Food Additives and Contaminants*, 19(6), 524-532.
- McKnight, G. M., Duncan, C. W., Leifert, C., & Golden, M. H. (1999). Dietary nitrate in man: friend or foe? *British Journal of Nutrition*, 81(5), 349-358.
- Meca, G., Mañes, J., Font, G., & Ruiz, M. J. (2011). Study of the potential toxicity of commercial crispy breads by evaluation of bioaccessibility and bioavailability of minor Fusarium mycotoxins. *Food and Chemical Toxicology*.
- Ohshima, H., & Miyoshi, N. (2010). Ingested nitrate and nitrite: beneficial to human health? *Genes and Environment*, 32(3), 43-52.
- Oomen, A. G., Hack, A., Minekus, M., Zeijdner, E., Cornelis, C., Schoeters, G., Verstraete, W., Van de Wiele, T., Wragg, J., Rompelberg, C. J., Sips, A. J., & Van Wijnen, J. H. (2002). Comparison of five in vitro digestion models to study the bioaccessibility of soil contaminants. *Environmental Science and Technology*, 36(15), 3326-3334.
- Oomen, A. G., Rompelberg, C. J. M., Bruil, M. A., Dobbe, C. J. G., Pereboom, D. P., & Sips, A. J. (2003). Development of an in vitro digestion model for estimating the bioaccessibility of soil contaminants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 44, 281-287.
- Oomen, A. G., van Twillert, K., Hofhuis, M. F. A., Rompelberg, C. J., & Versantvoort, C. H. (2003). Development and suitability of in vitro digestion models in assessing bioaccessibility of lead from toy matrices. *RIVM report 320102001*.

- Pardo-Marin, O., Yusa-Pelecha, V., Villalba-Martin, P., & Perez-Dasi, J. A. (2010). Monitoring programme on nitrates in vegetables and vegetable-based baby foods marketed in the Region of Valencia, Spain: levels and estimated daily intake. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 27(4), 478-486.
- Pippens, T. (2011). Nitrogen fixation. In Wikipedia (Ed.), Wikipedia. Consultado a 25-10-2011: [http://en.wikipedia.org/wiki/Nitrogen\\_fixation](http://en.wikipedia.org/wiki/Nitrogen_fixation) ed.): Wikipedia.
- Powlson, D. S., Addiscott, T. M., Benjamin, N., Cassman, K. G., Kok, T. M., van Grinsven, H., L'hirondel, J.-L., Avery, A. A., & van Kessel, C. (2008). When does nitrate become a risk for humans? *Journal of Environmental Quality*, 37, 291-295.
- PubChem. (2004). Nitrates - Compound Summary. In NCBI (Ed.), Consultado a 18-10-2011: <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=943>.
- Reinik, M., Tamme, T., & Roasto, M. (2007). Naturally occurring nitrates and nitrites in food. In J. Gilbert & H. Senyuva (Eds.), *Natural toxicants and heat processing contaminants*. London: Blackwell Publishers.
- Sahuquillo, A., Barberá, R., & Farré, R. (2003). Bioaccessibility of calcium, iron and zinc from three legume samples. *Nahrung Food*, 47(6), 438-441.
- Sanchez-Echaniz, J., Benito-Fernandez, J., & Mintegui-Raso, S. (2001). Methemoglobinemia and consumption of vegetables in infants. *Pediatrics*, 107(5), 1024-1028.
- Santamaria, P. (2006). Nitrate in vegetables: toxicity, content, intake and EC regulation. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 10-17.
- Siouffi, A. M. (2000). HPLC. In L. M. L. Nollet (Ed.), *Food analysis by HPLC* 2nd ed., (pp. 1-54). New York: Marcel Dekker.
- Skipton, S., & Hay, D. (1998). Drinking water: nitrate and methemoglobinemia ("Blue Baby" Syndrome). *Nebraska Cooperative Extension*, G98-1369
- Stuart, M. E., Goody, D. C., Bloomfield, J. P., & Williams, A. T. (2011). A review of the impact of climate change on future nitrate concentrations in groundwater of the UK. *Sci Total Environ*, 409(15), 2859-2873.
- Tamme, T., Reinik, M., Pussa, T., Roasto, M., Meremae, K., & Kiis, A. (2010). Dynamics of nitrate and nitrite content during storage of home-made and small-scale industrially produced raw vegetable juices and their dietary intake. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess*, 27(4), 487-495.
- Tamme, T., Reinik, M., Roasto, M., Juhkam, K., Tenno, T., & Kiis, A. (2006). Nitrates and nitrites in vegetables and vegetable-based products and their intakes by the Estonian population. *Food Addit Contam*, 23(4), 355-361.

- Tamme, T., Reinik, M., Roasto, M., Meremae, K., & Kiis, A. (2010). Nitrate in leafy vegetables, culinary herbs, and cucumber grown under cover in Estonia: content and intake. *Food Additives and Contaminants*, 3(2), 108-113.
- Tao, S., Lu, Y., Zhang, D., Yang, Y., Yang, Y., X., L., & Sai, D. (2009). Assessment of oral bioaccessibility of organochlorine pesticides in soil using an in vitro gastrointestinal model. *Environ Sci Technol*, 43, 4524-4529.
- van Velzen, A. G., Sips, A. J., Schothorst, R. C., Lambers, A. C., & Meulenbelt, J. (2008). The oral bioavailability of nitrate from nitrate-rich vegetables in humans. *Toxicol Lett*, 181(3), 177-181.
- Vasco, E., & Alvito, P. (2011). Occurrence and infant exposure assessment of nitrates in baby foods marketed in the region of Lisbon, Portugal. *Food Additives and Contaminants: Part B*, 4(3), 218-225.
- Vermeer, I. T. M., Pachen, D. M., Dallinga, J. W., Kleinjans, J. C., & Van Maanen, J. M. (1998). Volatile N-Nitrosamine Formation after Intake of Nitrate at the ADI Level in Combination with an Amine-rich Diet. *Environmental Health Perspectives*, 106(8), 459-463.
- Versantvoort, C. H., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rompelberg, C. J., & Sips, A. J. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food Chemistry and Toxicology*, 43(1), 31-40.
- Versantvoort, C. H., van de Kamp, E., & Rompelberg, C. J. (2004). Development and applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of contaminants from food. *RIVM report 320102002*.
- Ward, M. H., Kilfoy, B. A., Weyer, P. J., Anderson, K. E., Folsom, A. R., & Cerhan, J. R. (2010). Nitrate intake and the risk of thyroid cancer and thyroid disease. *Epidemiology*, 21(3), 389-395.
- WHO. About risk analysis in food. In): World Health Organization. Consultado a 20-10-2011: <http://www.who.int/foodsafety/micro/riskanalysis/en/#>.
- WHO. World Health Organization. Children's environmental health: Environmental risks. Consultado a 13-10-2011: <http://www.who.int/ceh/risks/en/>. In).
- WHO. (2001). Complementary feeding: report of the global consultation, and summary of guiding principles for complementary feeding of the breastfed child. *Geneva: World Health Organization*.
- WHO. (2011a). Guidelines for drinking-water quality. *World Health Organization*, WA 675.
- WHO. (2011b). Nitrate and nitrite in drinking-water. Background document for preparation of WHO Guidelines for drinking-water quality. *World Health Organization*, WHO/SDE/WSH/07.01/16



- WHO/FAO. (2009). Environmental Health Criteria 240: Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food.
- Willer, H., Yussefi-Menzler, M., & Sorensen, N. (2008). *The world of organic agriculture. Statistics and emerging trends 2008*. Switzerland: International Federation of Organic Agriculture Movements (IFOAM) and Bonn, Germany and Research Institute of Organic Agriculture (FiBL).

## 7. ANEXOS

**ANEXO I.** Amostras de alimentos preparados para crianças contendo carne ou peixe.

<b>Descrição</b>	<b>Marca</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>Idade</b>	<b>Origem</b>	<b>Local de aquisição</b>
<b>Legumes</b>	A	Feijão-verde 52%, água de cozedura, batata 14%, arroz branco, maltodextrina, amido de milho, sal e vitamina C.	a partir dos 4 meses	Convencional	Jumbo Alfragide - área saúde
<b>Puré com pedaços à base de feijão-verde, arroz e solha tropical</b>	B	Água, feijão-verde 23%, batata 20%, arroz cozido 13,5%, solha tropical 11%, cebola, amido modificado de milho, óleo de colza e óleo de girassol, sumo de limão reconstituído, salsa 0,4%, alho, sal.	a partir dos 12 meses	Convencional	Jumbo Alfragide
<b>Ervilhas e Arroz</b>	C	Legumes 58%, ervilhas, milho doce, cenoura, brócolos, água de cozedura de arroz.	a partir dos 6 meses	Biológico	Jumbo Alfragide
<b>Legumes Verdes e Borrego</b>	D	Legumes 38,3% (batatas, feijão verde, 4,1%, ervilhas 3,7%, espinafres 2%, cebolas, aipo), água de cozedura, carne de borrego 8,1%, amido modificado de milho, coentros, óleos vegetais, sal, alho, aromas naturais (badiana, cominho), canela, vitaminas.	a partir dos 6 meses	Convencional	Continente Telheiras
<b>Legumes com salmão</b>	D	Legumes 53,9% (batatas 25,2%, Courgettes, 9%, cenouras 8,3%, ervilhas 3,8%, espinafres 5%, cebolas, aipo, nabos), água de cozedura, salmão do pacífico 8%, leite magro, amido modificado de milho, natas, óleos vegetais, salsa, sal, alho, aromas naturais (noz moscada e pimenta), vitaminas.	a partir dos 8 meses	Convencional	Continente Telheiras
<b>Juliana de legumes</b>	D	Água de cozedura, legumes 27% (cenouras 14,1%, cebolas 3,5%, ervilhas 3,8%, nabos 2,3%, espinafres 2,2%, feijão verde 1,9%), batatas 7%, leite magro, arroz 4,5%, amido modificado de milho, óleos vegetais, sal, alho, aromatizantes (pimenta, tomilho, louro, cravo da índia), vitaminas.	a partir dos 12 meses	Convencional	Continente Telheiras
<b>Brócolos e Cenouras</b>	C	Cenouras 55%, brócolos 40%, cebolas, salsa.	a partir dos 4 meses	Biológico	BioCoop

Descrição	Marca	Ingredientes	Idade	Origem	Local de aquisição
<b>Espinafres com arroz</b>	E	Água, espinafre 20%, batata, arroz 10%.	a partir dos 4 meses	Biológico	BioCoop
<b>Béchamel com pescada</b>	F	Água de cozedura, pescada 12%, farinha de arroz, leite em pó magro, lactose, manteiga, amido de milho, amido de arroz, óleos vegetais, sal, emulsionante (lecitina de soja), noz-moscada.	a partir dos 8 meses	Convencional	Continente Telheiras
<b>Arroz com frango e cenoura</b>	F	Água de cozedura, frango 12%, batata, cenoura 8%, arroz 4%, amido de milho, leite em pó magro, lactose, óleos vegetais, sal, emulsionante (lecitina de soja).	a partir dos 4 meses	Convencional	Continente Telheiras
<b>Legumes e pato</b>	C	Legumes 76% (cenoura de Holanda, abóbora Alemanha, cenoura Centre Vale-de-Loire, cebola de Espanha), água de cozedura, Pato de Poitou (9,5%), sumo de limão da Sicília.	a partir dos 8 meses	Biológico	BioCoop
<b>Creme de ervilhas</b>	G	Ervilhas (50%), água, amido de milho.	a partir dos 6 meses	Convencional	Continente Telheiras
<b>Frango com Legumes</b>	A	Água de cozedura, cenoura, frango 20%, arroz, ervilha, amido de milho, sumo de limão, azeite 0,5% e sal.	a partir dos 4 meses	Convencional	Continente Wells
<b>Legumes e truta</b>	C	Legumes (59%), (cenouras de Centre Vale de Loire, batata de Pas de Calais, cebola de Espanha, abóbora de la Drôme), água de cozedura, Truta elevada do Lac de Montbel (Ariege) 9,5%, arroz longo branco da Itália 5%, sumo de limão de Itália, Salsa de Ile-de-France.	a partir dos 8 meses	Biológico	Brio
<b>Legumes e frango</b>	C	Legumes (71%), (cenouras de Landes, batata de Pas de Calais, milho doce de Aquitaine, cebola de Espanha), água de cozedura, Frango de poitou (9,5%), Salsa de Drôme.	a partir dos 8 meses	Biológico	Brio

<b>Descrição</b>	<b>Marca</b>	<b>Ingredientes</b>	<b>Idade</b>	<b>Origem</b>	<b>Local de aquisição</b>
<b>Legumes e bacalhau</b>	C	Legumes (67%), (Ervilhas da Alemanha, batata de Pas de Calais, cenouras da Holanda, cebola de espanha), água de cozedura, Bacalhau selvagem da Islandia (8%), Salsa de Ile-de-France.	a partir dos 8 meses	Biológico	Brio
<b>Sopa legumes verdes</b>	C	Legumes (50%), legumes verdes (37%), alho-porro da Alemanha, feijão verde da Holanda, cebola de Espanha, água do arroz branco da Itália 5%, salsa de França.	a partir dos 4 meses	Biológico	Brio
<b>Legumes e macarrão</b>	C	Legumes 66% (batata de Pas de Calais, cenouras da Holanda, tomates de espanha, cebola de espanha, milho doce de Holanda), água de cozedura, macarrão de Itália (semolina) 4%, Salsa de Ile-de-France.	a partir dos 8 meses	Biológico	Oferecido
<b>Legumes e vitela</b>	C	Legumes 77% (batata de Pas de Calais, cenouras da Holanda, tomates de espanha, cebola de espanha, cogumelos de Dordogne de Paris), água de cozedura, ensopado de vitela de Aquitaine 9,5%, tomilho de Ile-de-France.	a partir dos 8 meses	Biológico	Oferecido
<b>Feijão-verde e batatas ao vapor com vitela</b>	F	-	a partir dos 6 meses	Convencional	-

**ANEXO II.** Folha de cálculo interna INSA para a concentração de nitrato em amostras.

PARÂMETRO:	<b>Nitratos</b>					
Nº/Data de Entrada:						
Amostra:						
Observações:						
Toma de Amostra	1	2	3	4	5	6
Data de análise:						
Executante:						
Pasta Nº:						
Diluição na técnica	1					
Rectas de Calibração: Y (área) vs. X (µg/mL)						
Resíduos ≤ 10 %						
Coeficiente correlação (r) ≥ 0,995						
Toma da amostra (g)						
Volume em que a amostra é diluída (mL)						
Concentração do padrão (µg/mL)						
Volume do padrão adicionado (mL)						
Diluição posterior						
Concentração Sol. Analisadas (µg/mL)						
Concentração da Toma de Amostra (mg/kg amostra)	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!	#DIV/0!
<b>Concentração Média da Amostra (mg/kg Amostra)</b>	#DIV/0!			#DIV/0!		
Repetibilidade (CV <sub>r</sub> =5%)	#DIV/0!			#DIV/0!		
Taxa de recuperação (%)	#DIV/0!			#DIV/0!		
r (repetibilidade)	#DIV/0!			#DIV/0!		

**Resultado Final:**

**Confirmação (Rubrica e data):**

**Validação (Rubrica e data):**

## Bioacessibilidade - Sucos

### Nitratos-HPLC-UV

**Saliva**

**EXP**

Analista:

Data:

Série de trabalho:

Data (HPLC):

Analista:

Volume total: 250 ml

#### Composição inorgânica:

	<u>massa teórica:</u>	<u>pesagem:</u>
KCl	224 mg	_____ mg
KSCN	50 mg	_____ mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	255,25 mg	_____ mg
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	142,5 mg	_____ mg
NaCl	74,5 mg	_____ mg
NaHCO <sub>3</sub>	423,5 mg	_____ mg

#### Composição orgânica:

	<u>massa teórica:</u>	<u>pesagem:</u>
Ureia	50 mg	_____ mg

Dissolver componente orgânica e inorgânica em 250 mL de água MilliQ, com agitação contínua  
Adicionar as enzimas:

#### Substâncias adicionais (enzimas):

	<u>massa teórica:</u>	<u>pesagem:</u>
Amilase	72,5 mg	_____ mg
Ácido úrico	3,75 mg	_____ mg
Mucina	6,3 mg	_____ mg

#### pH teórico 6,5 ± 0,2

valor de pH medido antes da correção do pH \_\_\_\_\_  
valor de pH medido depois da correção do pH \_\_\_\_\_  
NaOH 1M \_\_\_\_\_ µl  
HCl (37% concentrado) \_\_\_\_\_ µl

Registo Balança (nº inv./sala): \_\_\_\_\_

## Bioacessibilidade - Sucos

### Nitratos-HPLC-UV

#### Suco gástrico

EXP

Analista:

Data:

Série de trabalho:

Data (HPLC):

Analista:

Volume total: 500 ml

#### Composição inorgânica:

	<u>massa/volume teórico:</u>	<u>pesagem:</u>
NaCl	1376 mg	_____ mg
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	153 mg	_____ mg
KCl	412 mg	_____ mg
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	200 mg	_____ mg
NH <sub>4</sub> Cl	153 mg	_____ mg
HCl (37%)	3,25 ml	_____ ml

#### Composição orgânica:

	<u>massa teórica:</u>	<u>pesagem:</u>
Glucose	325 mg	_____ mg
Ácido glucorónico	10 mg	_____ mg
Ureia	42,5 mg	_____ mg
D(+) glucoseamina	165 mg	_____ mg

Dissolver componente orgânica e inorgânica em 500 mL de água MilliQ com agitação contínua  
Adicionar as enzimas:

#### Substâncias adicionais (enzimas):

	<u>massa teórica:</u>	<u>pesagem:</u>
BSA	500 mg	_____ mg
Pepsina	1250 mg	_____ mg
Mucina	1500 mg	_____ mg

#### pH teórico 1,3 ± 0,1

valor de pH medido antes da correcção do pH \_\_\_\_\_  
valor de pH medido depois da correcção do pH \_\_\_\_\_  
NaOH 1M \_\_\_\_\_ µl  
HCl (37% concentrado) \_\_\_\_\_ µl

Registo Balança (nº inv./sala): \_\_\_\_\_



## Bioacessibilidade - Sucos

### Nitratos-HPLC-UV

#### Suco duodenal

EXP

Analista:

Data:

Série de trabalho:

Data (HPLC):

Analista:

Volume total: 500 ml

#### Composição inorgânica:

	<u>massa/volume teórico:</u>	<u>pesagem:</u>
NaCl	3506 mg	_____ mg
NaHCO <sub>3</sub>	1694 mg	_____ mg
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	40 mg	_____ mg
KCl	282 mg	_____ mg
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	25 mg	_____ mg

#### Composição orgânica:

	<u>massa teórica:</u>	<u>pesagem:</u>
Ureia	50 mg	_____ mg

Dissolver componente orgânica e inorgânica em 500 mL de água MilliQ com agitação contínua  
Adicionar as enzimas:

#### Substâncias adicionais (enzimas):

	<u>massa teórica:</u>	<u>pesagem:</u>
BSA	0,5 g	_____ g
Pancreatina	4,5 g	_____ g
Lipase	0,8 g	_____ g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	100 mg	_____ mg

#### pH teórico 8,1 ± 0,2

valor de pH medido antes da correcção do pH \_\_\_\_\_  
valor de pH medido depois da correcção do pH \_\_\_\_\_  
NaOH 1M \_\_\_\_\_ µl  
HCl (37% concentrado) \_\_\_\_\_ µl

Registo Balança (nº inv./sala): \_\_\_\_\_

## Bioacessibilidade - Sucos

### Nitratos-HPLC-UV

#### Suco biliar

EXP

Analista:

Data:

Série de trabalho:

Data (HPLC):

Analista:

Volume total: 250 ml

#### Composição inorgânica:

	<u>massa/volume teórico:</u>	<u>pesagem:</u>
NaCl	1315 mg	_____ mg
NaHCO <sub>3</sub>	1446 mg	_____ mg
KCl	94 mg	_____ mg
HCl (37%)	37,5 µl	_____ µl

#### Composição orgânica:

	<u>massa teórica:</u>	<u>pesagem:</u>
Ureia	63 mg	_____ mg

Dissolver componente orgânica e inorgânica em 250 mL de água MilliQ com agitação contínua  
Adicionar as enzimas:

#### Substâncias adicionais (enzimas):

	<u>massa teórica:</u>	<u>pesagem:</u>
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	55,5 mg	_____ mg
BSA	450 mg	_____ mg
Bilis	7500 mg	_____ mg

#### pH teórico 8,2 ± 0,2

valor de pH medido antes da correcção do pH \_\_\_\_\_  
valor de pH medido depois da correcção do pH \_\_\_\_\_  
NaOH 1M \_\_\_\_\_ µl  
HCl (37% concentrado) \_\_\_\_\_ µl

Registo Balança (nº inv./sala): \_\_\_\_\_

# Bioacessibilidade sucos - pH

## Registo e calibração do aparelho de pH

Plano de investigação	
Operador	

EXP

Referência aparelho pH:

Data	Etapa da digestão	Hora	Declive	pH 4,00	pH 7,00	pH obtido	Temp	Rubrica

**ANEXO V.** Folha de registo das pesagens das amostras para digestão

		Digestão Nitratos - Pesagens				
Data						
Data da digestão				Dia da digestão		
Data das pesagens				Experiência Nº		
Operadores						
Numero	Amostra	Amostra	Quantidade	Peso	Quantidade	Peso
tubos		Nº entrada	pd referência (µl)	Amostra (g)	Alimento (g)	Alimento (g)
1	Branco				0,0	
2	Branco				0,0	
3	Amostra				4,5	
4	Amostra				4,5	
5	Amostra				4,5	
6	Amostra				4,5	
7	Amostra				4,5	
8	Amostra				4,5	
9	Amostra				4,5	
10	Amostra				4,5	
11	Amostra				4,5	
12	Amostra				4,5	
13	Amostra				4,5	
14	Amostra				4,5	
15	Amostra				4,5	
16	Amostra				4,5	
17	Amostra				4,5	
18	Amostra				4,5	
19	Amostra				4,5	
20	Amostra				4,5	
21	Amostra				4,5	
22	Amostra				4,5	
23	Amostra				4,5	
24	Amostra				4,5	

**ANEXO VI.** Folha de registo dos pH obtidos durante a digestão e possíveis acertos.

		Digestão Nitratos - pH							
	Data								
	Data da digestão		Dia da digestão						
	Data das pesagens		Experiência Nº						
	Operadores								
Numero	Sample name	pH fase gástrica $2,5 \pm 0,5$				pH fase intestinal - $6,5 \pm 0,5$			
tubos		antes	ajuste ( $\mu\text{L}$ )	pH	após 2 h	antes	ajuste ( $\mu\text{L}$ )	pH	após 2 h
1	Branco								
2	Branco								
3	Amostra								
4	Amostra								
5	Amostra								
6	Amostra								
7	Amostra								
8	Amostra								
9	Amostra								
10	Amostra								
11	Amostra								
12	Amostra								
13	Amostra								
14	Amostra								
15	Amostra								
16	Amostra								
17	Amostra								
18	Amostra								
19	Amostra								
20	Amostra								
21	Amostra								
22	Amostra								
23	Amostra								
24	Amostra								

**ANEXO VII.** Folha de cálculo da bioacessibilidade das amostras.

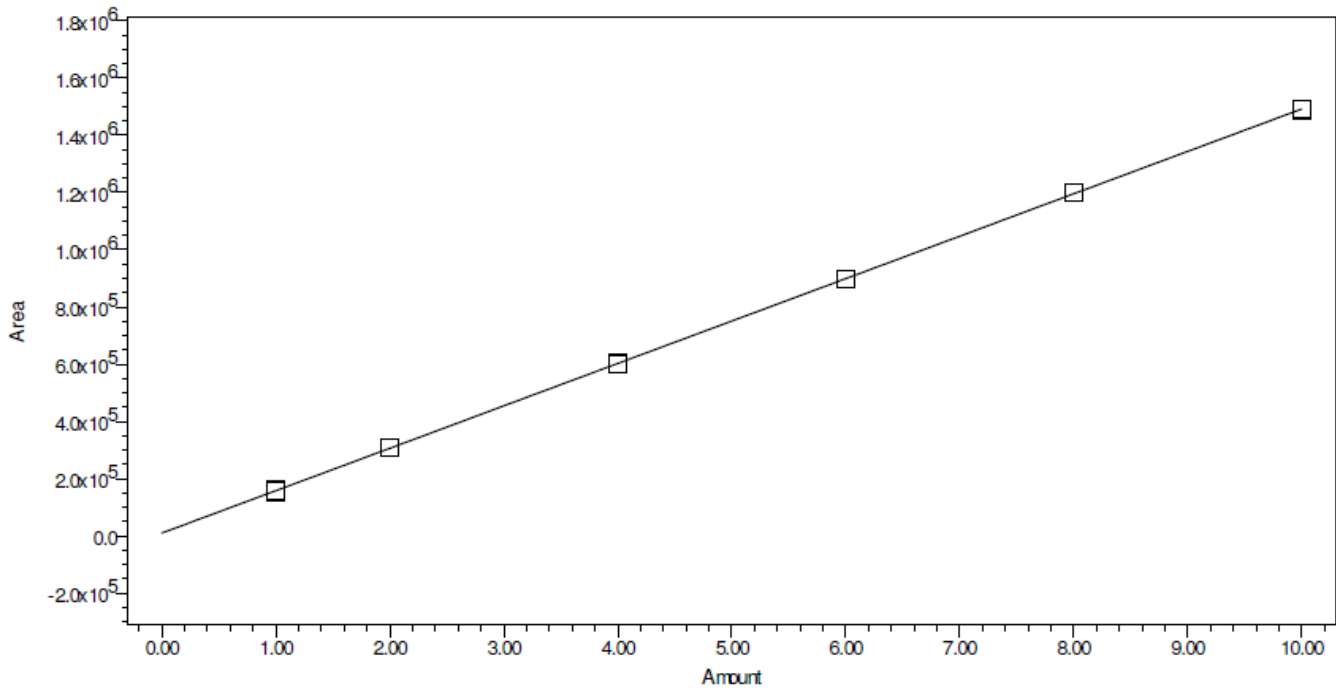
Bioacessibilidade da NITRATOS em alimentação infantil												
2,0375g/25mL- padrão nitratos												
Valores todos calculados através da curva de calibração do HPLC											Réplicas	Réplicas
Material em Estudo	Quantidade matriz (g)	Quantidade refeição controlo (g)	Quantidade HCl/NaOH adicionada (ml)	Concentração µg/mL	Concentração corrigida (µg/mL)	Quantidade no volume final de extracção (µg)	Quantidade no volume total do quimo (µg)	Concentração após digestão (µg/g = mg/kg matriz)	Concentração Total na Matriz (mg/kg matriz)	Bioacessibilidade (%)	SD	CV=SD/mx100
Branco	0,0000	0,00										
Branco	0,0000	0,00										
Branco (média)		0,00										
Amostra		0,00										
Amostra		0,00										
Média		0,00										
Amostra		0,00										
Amostra		0,00										
Média		0,00										
Amostra		0,00										
Amostra		0,00										
Média		0,00										
Amostra		0,00										
Amostra		0,00										
Média		0,00										
Amostra		0,00										
Amostra		0,00										
Média		0,00										

# ANEXO VIII. Exemplo de um relatório de calibração.



## LC Calibration Report

Processing Method:	SS20110602N	System:	HPLC5
Processing Method ID:	24799	Channel:	W2996 210.0nm-1.2
Calibration ID:	24801	Proc. Chnl. Descr.:	W2996 PDA 210.0 nm at 1.2
Date Calibrated:	6/3/2011 1:09:07 PM Europe/Lisbon		



Peak Name: Nitratos; RT: 4.221; Fit Type: Linear (1st Order); Cal Curve Id: 24802; R: 0.999988; R<sup>2</sup>: 0.999976; Weighting: None; Equation:  $Y = 1.48e+005 X + 1.01e+004$ ; Standard Error 2.547242e+003

### Peak: Nitratos

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore	Residual Sum of Squares
1	P1	24840	Nitratos		1.000	154381.002	0.974	2.70	No	No	6.488442e+007
2	P1	24841	Nitratos		1.000	160083.501	1.012	-1.20	No	No	6.488442e+007
3	P2	24842	Nitratos		2.000	308362.501	2.013	-0.64	No	No	6.488442e+007
4	P2	24843	Nitratos		2.000	308534.502	2.014	-0.70	No	No	6.488442e+007
5	P3	24844	Nitratos		4.000	601640.003	3.992	0.19	No	No	6.488442e+007
6	P3	24845	Nitratos		4.000	602223.005	3.996	0.09	No	No	6.488442e+007
7	P4	24846	Nitratos		6.000	897409.999	5.989	0.19	No	No	6.488442e+007
8	P4	24847	Nitratos		6.000	896582.251	5.983	0.28	No	No	6.488442e+007

Reported by User: Elsa Vasco (Evasco)  
 Report Method: LC Calibration Report  
 Report Method ID: 13: 13270  
 Page: 1 of 2

Project Name: ReferencialNitratos  
 Date Printed:  
 6/3/2011  
 1:09:43 PM Europe/Lisbon

**Peak: Nitratos**

	Sample Name	Result Id	Peak Name	Level	X Value	Response	Calc. Value	% Deviation	Manual	Ignore	Residual Sum of Squares
9	P5	24848	Nitratos		8.000	1198998.998	8.024	-0.30	No	No	6.488442e+007
10	P5	24849	Nitratos		8.000	1198606.526	8.022	-0.27	No	No	6.488442e+007
11	P6	24850	Nitratos		10.000	1489777.745	9.987	0.13	No	No	6.488442e+007
12	P6	24851	Nitratos		10.000	1490842.501	9.994	0.06	No	No	6.488442e+007





## SAMPLE INFORMATION

Acquired By: Evasco  
 Date Acquired: 6/2/2011 6:54:50 PM Europe/Lisbon,  
 Acq. Method Set: Nitratos\_set  
 Date Processed: 6/3/2011 1:07:18 PM Europe/Lisbon,  
 Processing Method: SS20110602N  
 Sample Set Name: 20110602N

## Peak Summary with Statistics

## Vial: 8

	Sample Name	Name	Vol. Inj. (uL)	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Amount
1	P2C	Nitratos	20.00	8	1	4.221	311278	100.00	50638	2.033
2	P2C	Nitratos	20.00	8	2	4.221	311255	100.00	50729	2.032
Mean						4.221				2.033
Std. Dev.						0.000				0.000
% RSD						0.00				0.005

## Peak Summary with Statistics

## Vial: 9

	Sample Name	Name	Vol. Inj. (uL)	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Amount
1	P4C	Nitratos	20.00	9	1	4.222	902296	100.00	147546	6.022
2	P4C	Nitratos	20.00	9	2	4.222	901090	100.00	147311	6.014
Mean						4.222				6.018
Std. Dev.						0.000				0.006
% RSD						0.00				0.096

## Peak Summary with Statistics

## Vial: 10

	Sample Name	Name	Vol. Inj. (uL)	Vial	Inj	Retention Time (min)	Area	% Area	Height	Amount
1	141218 1	Nitratos	20.00	10	1	4.183	257823	100.00	31391	1.672
2	141218 1	Nitratos	20.00	10	2	4.185	242377	100.00	29860	1.568
Mean						4.184				1.620
Std. Dev.						0.001				0.074
% RSD						0.04				4.551

**ANEXO X.** Resultados das análises de nitratos nas amostras das 3 séries realizadas ao longo de 3 dias

PARÂMETRO:

**Nitratos**

Nº/Data de Entrada:

31-05-2011

Amostra:

Legumes e massa

Observações:

SS20110531N

Toma de Amostra	140184	140187	140188	140190	140191	140192
Data de análise:	30-05-2011					
Executante:	ZCP					
Pasta Nº:						
Diluição na técnica	1					
Rectas de Calibração: Y(área) vs X(µg/mL)						
Resíduos $\leq 10 \%$	Sim					
Coeficiente correlação ( $r \geq 0,995$ )	Sim					
Toma da amostra (g)	10,0033	10,1157	10,1027	10,0212	10,1402	10,1353
Volume em que a amostra é diluída (mL)	200	200	200	200	200	200
Diluição posterior	1	1	1	1	1	1
Concentração Sol. Analisadas (µg/mL)	1,6460	1,6770	1,6220	1,6030	1,6200	1,6190
Concentração da Toma de Amostra (mg/100g amostra)	32,9091	33,1564	32,1102	31,9922	31,9520	31,9477
<b>Concentração Média da Amostra (mg/100g Amostra)</b>	<b>32,3446</b>					
repetibilidade ( $CV_r=5\%$ )	OK					
$r$ (repetibilidade)	6,4689					

**Resultado Final:**

**Confirmação (Rubrica e data):**

**Validação (Rubrica e data):**

**ANEXO XI.** Folha de cálculo totalmente preenchida com os dados e resultados relativos à repetibilidade

<div>DADOS DE PRECISÃO</div> <div>Preencher as células verdes</div> <div></div>		Natureza da amostra	Legumes e massa		
		Descrição da amostra			
		Método			
		DADOS / série			
		Data de análise	31-05-2011		
		Série (i)	1	2	3
		n			
		1	32,9091	32,6315	33,3327
		2	33,1564	32,3779	34,7142
3	32,1102	32,8310	33,1234		
4	31,9922	34,9679	31,6496		
5	31,9520	33,1340	32,9978		
6	31,9477	33,2624	34,3186		
Nºensaios por Operador	n		6	6	6
Média	$\bar{x}$		32,3446	33,2008	33,3561
Desvio Padrão	S		0,54193597	0,924004129	1,083146357
Variância	S <sup>2</sup>		0,293694596	0,853783630	1,173206031
CV%	CV%		1,675506794	2,783079301	3,247225939
Desvio padrão da repetibilidade	S <sub>ri</sub>	1,083146357			
Variância da repetibilidade	S <sub>ri</sub> <sup>2</sup>	1,173206031			
Limite de repetibilidade	r	3,0328098			

**ANEXO XII.** Folha de cálculo totalmente preenchida com os dados e resultados relativos à precisão intermédia.

**DADOS DE PRECISÃO**

Natureza da amostra	Legumes e massa					
Descrição da amostra						
Método						
DADOS / série					0	
Data de análise						
Série (i)	1		2		3	
n						
1	32,9091	-0,058044952	32,6315	-0,335644952	33,33267549	0,365530543
2	33,1564	0,189255048	32,3779	-0,589244952	34,71420036	1,747055406
3	32,1102	-0,856944952	32,831	-0,136144952	33,12343315	0,156288199
4	31,9922	-0,974944952	34,9679	2,000755048	31,64961323	-1,317531726
5	31,952	-1,015144952	33,134	0,166855048	32,99777957	0,030634618
6	31,9477	-1,019444952	33,2624	0,295255048	34,31860734	1,351462386
Nº de ensaios por operador	n	6	6	6	6	
Média dos ensaios de todos os operadores (N ensaios)	$\bar{y}$	32,96714495				
Numero total de determinações total	N	18				
	$\sum (y - \bar{y})^2$	15,16380587				
Desvio padrão da precisão intermédia	$S_{pi}$	0,944451471				
Variância da precisão intermédia	$S_{pi}^2$	0,891988581				
Limite de precisão intermédia	$P_i$	2,644464118				
CV%	CV%	2,864826397				

**ANEXO XIII.** Distribuição não gaussiana dos teores de nitratos em amostras de origem convencional

	Convencional	Ordenados	K		
	164	24	1	24	
	62	34	2	34	
	43	43	3	43	
	54	43	4	43	
	34	54	5	54	
	66	55	6	55	164
	43	62	7	62	97
	97	66	8	66	66
	24	97	9	97	62
	55	164	10	164	55
Média Total	64				
SD	40				
Mediana	55				

k	n+1-k	$x_k$	$x_{n+1-k}$	$x_{n+1-k} - x_k$	$a_k$	$a_k \cdot (x_{n+1-k} - x_k)$
1	10	24	164	140	0,5739	80,3460
2	9	34	97	63	0,3291	20,7333
3	8	43	66	23	0,2141	4,9243
4	7	43	62	19	0,1224	2,3256
5	6	54	55	1	0,0399	0,0399
					S	108,3691

▪ A equação para VARPA é :

$$\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}$$

Assim;

$$\text{VARPA x N é} = nm_2 = \sum (x_i - \bar{x})^2$$

$$nm_2 = 14659,6$$

$$W_{\text{calculado}} = 0,8011$$

$$W_{\text{tabela}} = 0,842$$

Se o  $W_{\text{calculado}} < W_{\text{tabela}}$  não é uma distribuição normal

**ANEXO XIV.** Distribuição normal para as amostras ditas biológicas

	Biológico	Ordenados	K		
	41	28	1	28	
	115	33	2	33	
	139	41	3	41	
	100	45	4	45	
	77	52	5	52	
	52	77	6	77	139
	45	91	7	91	115
	91	100	8	100	100
	28	115	9	115	91
	33	139	10	139	77
Média Total	72				
SD	38				
Mediana	65				

k	n+1-k	x <sub>k</sub>	x <sub>n+1-k</sub>	x <sub>n+1-k</sub> - x <sub>k</sub>	a <sub>k</sub>	a <sub>k</sub> · (x <sub>n+1-k</sub> - x <sub>k</sub> )
1	10	28	139	111	0,5739	63,7029
2	9	33	115	82	0,3291	26,9862
3	8	41	100	59	0,2141	12,6319
4	7	45	91	46	0,1224	5,6304
5	6	52	77	25	0,0399	0,9975
					S	109,9489

▪ A equação para VARPA é :

$$\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n}$$

Assim;

$$\text{VARPA x N } \hat{=} nm_2 = \sum (x_i - \bar{x})^2$$

$$nm_2 = 13054,9$$

$$W_{\text{calculado}} = 0,9260$$

$$W_{\text{tabela}} = 0,842$$

Se o  $W_{\text{calculado}} > W_{\text{tabela}}$  é uma distribuição normal

**ANEXO XV.** Teste F (Fisher) e de t de student para as amostras de origem biológica e convencional.

**Comparar as médias para ver se são estatisticamente iguais, usando um teste de hipóteses.**

Decidir entre o teste de comparação de médias com variância iguais ou de variâncias desiguais.

Teste F: duas amostras para variâncias

	<i>Convencional</i>	<i>Biológico</i>
Média	64,2	72,1
Variância	1628,844444	1450,544444
Observações	10	10
gl	9	9
F	1,122919364	
P(F<=f) uni-caudal	0,432860028	
F crítico uni-caudal	3,178893105	

Variâncias Iguais, então usar o teste de comparação de médias para variâncias iguais.

Teste T: duas amostras com variâncias iguais

	<i>Variável 1</i>	<i>Variável 2</i>
Média	64,2	72,1
Variância	1628,844444	1450,544444
Observações	10	10
Variância agrupada	1539,694444	
Hipótese de diferença de média	0	
gl	18	
Stat t	-0,450188941	
P(T<=t) uni-caudal	0,328974587	
t crítico uni-caudal	1,734063592	
P(T<=t) bi-caudal	0,657949175	
t crítico bi-caudal	2,100922037	

**Conclusão: As médias não diferem estatisticamente**

**ANEXO XVI.** Valores obtidos nas análises de nitratos durante os períodos de armazenamento a 4°C e a -20°C.

<b>Alimento</b>	<b>Valor de Referência (mg/Kg)</b>	<b>Intervalo de variação</b>	<b>Temperatura de armazenamento</b>	<b>Data</b>	<b>Resultados (mg/Kg)</b>
<b>Legumes</b>	164	151-177	4°C	Semana 1	168
				Semana 2	170
				Semana 3	156
			-20°C	Mês 1	174
				Mês 2	175
<b>Legumes Verdes e Borrego</b>	57	52-62	4°C	Semana 1	51
				Semana 2	60
				Semana 3	45
			-20°C	Mês 1	41
				Mês 2	51
<b>Legumes com salmão</b>	106	98-114	4°C	Semana 1	114
				Semana 2	103
				Semana 3	108
			-20°C	Mês 1	102
				Mês 2	98
<b>Brócolos e Cenouras</b>	139	128-150	4°C	Semana 1	135
				Semana 2	147
				Semana 3	84
			-20°C	Mês 1	149
				Mês 2	135
<b>Legumes e truta</b>	77	71-83	4°C	Semana 1	76
				Semana 2	61
				Semana 3	77
			-20°C	Mês 1	74
				Mês 2	72



Alimento	Valor de Referência (mg/Kg)	Intervalo de variação	Temperatura de armazenamento	Data	Resultados (mg/Kg)
Espinafres com arroz	115	106-124	4°C	Semana 1	114
				Semana 2	115
				Semana 3	50
				Semana 4	15
			-20°C	Mês 1	113
				Mês 2	113
				Mês 3	119
Ervilhas e Arroz	41	38-44	4°C	Semana 1	38
				Semana 2	31
				Semana 3	31
				Semana 4	45
			-20°C	Mês 1	31
				Mês 2	32
				Mês 3	29
Frango com Legumes	66	61-71	4°C	Semana 1	65
				Semana 2	65
				Semana 3	58
				Semana 4	49
			-20°C	Mês 1	69
				Mês 2	70
				Mês 3	71
Legumes e bacalhau	45	41-49	4°C	Semana 1	44
				Semana 2	24
				Semana 3	23
				Semana 4	20
			-20°C	Mês 1	24
				Mês 2	31
				Mês 3	28
Legumes e vitela	28	26-30	4°C	Semana 1	30
				Semana 3	27
				Semana 4	26
			-20°C	Mês 1	30
				Mês 2	32
				Mês 3	35